

Fakultät für Physik und Astronomie
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Diplomarbeit
im Studiengang Physik
vorgelegt von
Tillmann Kaudse
aus Titisee-Neustadt

2009

Erweiterung eines Einzelmolekül-FRET-Spektrometers um alternierende Laseranregung und Charakterisierung des Systems

Diese Diplomarbeit wurde ausgeführt von

Tillmann Kaudse

am

Deutschen Krebsforschungszentrum

unter der Betreuung von

Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski

sowie von

Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer

vom Kirchhoff-Institut für Physik

Zusammenfassung

Erweiterung eines Einzelmolekül-FRET-Spektrometers um alternierende Laseranregung und Charakterisierung des Systems

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein Effekt, bei dem die Energie eines durch einen Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (der Donor) strahlungsfrei auf einen zweiten (den Akzeptor) übertragen wird. Da die Effizienz dieser Energieübertrag vom gegenseitigen Abstand der beiden Farbstoffe abhängt, können mit dieser Technik Distanzen im Bereich von 2 - 8 nm ermittelt werden. Markiert man zum Beispiel ein Enzym an passenden Stellen mit einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff, so lassen sich Konformationsänderungen des Moleküls feststellen. Führt man FRET-Experimente an einzelnen Molekülen durch, so lassen sich Subpopulationen unterschiedlicher Konformationen ermitteln. Ein Nachteil herkömmlicher Einzelmolekül-FRET-Messungen liegt darin, dass kaum unterschieden werden kann zwischen einer nur mit dem Donor markierten Probe und einer doppelt markierten, bei der die Farbstoffe zu weit auseinander liegen, als dass ein Energietransfer stattfinden kann. Dieser Missstand lässt sich beheben, indem zusätzlich zum donoranregenden Laser in alternierender Weise ein weiterer Laser dazu benutzt wird, der den Akzeptor direkt anzuregen. Dadurch kann die Existenz eines Akzeptorfarbstoffs unabhängig vom Donor festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vorhandenes Einzelmolekül-FRET-Spektrometer um alternierende Laseranregung (ALEX) erweitert. Dazu war eine Steuerung zu installieren, die die Intensitäten der beiden Anregungslaser moduliert. Gleichzeitig musste im Messsignal vermerkt werden, durch welche Anregungswellenlänge ein detektiertes Photon erzeugt wurde. Für die Analyse der aufgezeichneten Daten aus ALEX-Messungen wurde ein Programm geschrieben. Dieses System wurde charakterisiert und der Einfluss unterschiedlicher Mess- und Analyseparameter auf das Ergebnis untersucht.

Abstract

Addition of alternating laser excitation on a single molecule FRET spectrometer and characterization of the setup

Förster resonance energy transfer (FRET) is an effect where the energy of an excited fluorescent dye (the donor) is nonradiatively transferred to a second dye (the acceptor). Because the efficiency of this energy transfer depends on the displacement of the two dyes relative to one another, it is possible to measure distances in the range of 2 - 8 nm. For example, if the donor and the acceptor are attached to specific sites of an enzyme one can observe conformational changes of the molecule. Performing FRET experiments on single molecules allows one to detect subpopulations within an ensemble of sample molecules. A drawback of traditional single molecule FRET measurements, however, is the difficulty to distinguish samples labeled with only a donor dye from doubly labeled ones, where the fluorophores are too distant from each other to make energy transfer. This problem can be solved by adding a second excitation laser in an alternating manner which activates the acceptor directly. Thereby the existence of an acceptor dye can be probed independently of the donor.

In the context of this thesis, an existing single molecule FRET spectrometer was upgraded with alternating laser excitation (ALEX). A control system for the intensities of both excitation lasers was installed. The alternation of the laser beams had to be synchronized with the measured signal to know the excitation source for each single detected photon. A program was written to analyse the ALEX data. Finally the setup was experimentally characterized and the influence of different measurement and analysis parameters is presented.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Theoretische Grundlagen | 5 |
| 2.1 | Grundlagen der Fluoreszenz | 5 |
| 2.2 | Theorie des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) | 7 |
| 2.2.1 | FRET-Effizienz E | 8 |
| 2.2.2 | Proximity Ratio P | 12 |
| 2.2.3 | Korrekturen der Photonenraten | 12 |
| 2.3 | Alternierende Laseranregung | 14 |
| 2.3.1 | Proximity Ratio P und Stöchiometriefaktor S | 15 |
| 2.3.2 | Unabhängigkeit von P und S | 19 |
| 3 | Das Einzelmolekülspektrometer mit alternierender Laseranregung | 21 |
| 3.1 | Das Einzelmolekülspektrometer | 21 |
| 3.1.1 | Der optische Aufbau | 21 |
| 3.1.2 | Erweiterungen und technische Verbesserungen | 24 |
| 3.2 | Erweiterung um alternierende Anregung | 27 |
| 4 | Das Programm zur Auswertung der ALEX-Daten | 31 |
| 4.1 | Burstanalyse mit fester Anzahl an Alternierungsperioden | 32 |
| 4.2 | Burstanalyse auf Basis der ganzen Burstlänge | 33 |
| 4.3 | Vergleich beider Auswerteroutinen | 34 |
| 5 | Charakterisierung des ALEX-Systems | 39 |
| 5.1 | Vorteile der alternierenden Laseranregung gegenüber herkömmlichen Einzelmolekül-FRET-Messungen | 39 |
| 5.2 | Überlappung der beiden Laserfoki | 43 |
| 5.3 | Antwortzeit des AOM | 45 |
| 5.4 | Einfluss wichtiger Mess- und Analyseparameter | 46 |
| 5.4.1 | Burstdauer und Anzahl Photonen pro Burst | 46 |
| 5.4.2 | Vergleich unterschiedlicher Anregungssequenzen | 52 |
| 5.5 | Bestimmung relativer Anteile einfach und doppelt markierter Spezies | 63 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick | 67 |
| 6.1 | Zusammenfassung | 67 |
| 6.2 | Ausblick | 68 |

| | |
|---|------------|
| A Anhang | 71 |
| A.1 Typischer Ablauf einer ALEX-Messung mit anschließender Auswertung | 71 |
| A.2 Ausgabemodi der Auswertesoftware | 72 |
| A.3 Aufstellung aller zur Auswertung zur Verfügung stehenden Parameter . | 74 |
| A.4 Die Theorie der Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (PDA) | 76 |
| A.5 Quellcode des Analyseprogramms für ALEX-Messdaten | 80 |
| Abbildungsverzeichnis | 101 |
| Tabellenverzeichnis | 103 |
| Literaturverzeichnis | 105 |

1 Einleitung

Bereits 1925 stellte J. Perrin eine Theorie vor, welche das Phänomen des Energietransfers von einem Molekül auf ein weiteres als resonante Wechselwirkung zweier elektrischer Dipole erklärt [38, 39]. Sein Sohn F. Perrin veröffentlichte 1932 eine quantenmechanische Version der Theorie [36, 37], welche zu exakt demselben Ergebnis führte: Eine Abhängigkeit des Energietransfers von der Wellenlänge und der mittleren Zeit zwischen zwei Zusammenstößen von Farbstoffen und Lösungsmittel. Diese Theorie konnte zunächst nicht experimentell überprüft werden, da keine präzisen Daten zu Kollisionszeiten vorlagen. In seiner wegweisenden Veröffentlichung [11] gelang es Theodor Förster 1948, diesen Energietransfer von einem angeregten Molekül (dem *Donor*) auf ein nicht-angeregtes Molekül (den *Akzeptor*) mit Hilfe von Lebensdauern und Anregungs- sowie Emissionsspektren zu beschreiben, welche wesentlich leichter zugänglich waren. Er führte zudem die später als Försterradius bekannt gewordene Größe R_0 ein. Diese beschreibt den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Wahrscheinlichkeit 50% beträgt, dass die Energie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird. Das Phänomen des resonanten Energietransfers wird heute als *Förster-Resonanzenergietransfer* (FRET) bezeichnet. Durch die Abhängigkeit des Energietransfers vom Abstand der Farbstoffe lässt sich FRET als „molekularer Zollstock“ für den Bereich zwischen 2 und 8 nm verwenden.

Obwohl es schon zuvor wegberaubende Arbeiten gab [4, 23], kann die Arbeit von Stryer und Haugland im Jahre 1967 [46] als Startpunkt für die Anwendung von FRET in der Biochemie und Biophysik angesehen werden. Darin eichten sie den spektroskopischen Zollstock, indem sie FRET-Experimente an verschiedenen langen L-Prolin-Oligopeptiden vornahmen und diese Ergebnisse mit theoretischen Modellen [7, 41] verglichen.

Aus der physikalischen Biochemie ist FRET heute nicht mehr wegzudenken: Enzyme können zum Beispiel in einer aktiven und einer inaktiven Form vorliegen, welche sich durch ihre molekulare Struktur unterscheiden. Markiert man diese an bestimmten Stellen mit passenden Fluoreszenzfarbstoffen, so können mit FRET Konformationsänderungen erkannt werden. Ebenso lässt sich im Prinzip die Wechselwirkung zweier Moleküle – eines mit einem Donorfarbstoff, das andere mit einem Akzeptor markiert – nachweisen, wenn die Fluorophore nah genug zueinander gebracht werden, dass ein Energietransfer stattfinden kann.

Da in den ersten Jahrzehnten FRET-Messungen nur an Ensembles von Molekülen durchgeführt wurden, ließen sich nur grundsätzliche strukturelle Fragen beantworten. Proteine liegen in einer Lösung im Allgemeinen jedoch nicht nur in einer Konformation vor. Heterogenitäten innerhalb der Probe können jedoch mit Ensemble-Messungen nicht aufgelöst werden. Dies ist ein grundsätzliches Problem aller Ensemblesmesstechniken.

niken, da die erhaltenen Daten einer Mittelung über viele Moleküle entsprechen. Aus der Kenntnis dieser Heterogenitäten ließen sich jedoch wichtige Informationen zu Subpopulationen oder kurzlebigen Übergangskonformationen der Moleküle gewinnen und damit bestehenden Modelle zur Faltung von Proteinen verbessern oder neue Theorien aufstellen. Diese Information kann man aus FRET-Messungen erhalten, wenn man jedes einzelne Teilchen für sich betrachtet. Die Abstandsverteilung der Fluorophore zeigt dann die zu Grunde liegende Heterogenität des Ensembles.

Die Möglichkeit einzelne Moleküle zu erfassen wurde zum ersten mal 1976 von T. Hirschfeld demonstriert [19]. Er detektierte einzelne Antikörper, welche jeweils mit einer großen Anzahl an Fluorophoren versehen waren. Einzelne Farbstoffmoleküle wurden erstmals 1989 in einem Kristall detektiert [32] und wenig später auch in Lösung [45]. 1996 wurden von T. Ha erste Einzelmolekül-FRET-Messungen gezeigt [17] und Heterogenitäten innerhalb eines Ensembles kurze Zeit später aufgelöst [9].

Heutzutage hat sich die Einzelmolekül-FRET-Technik zu einem mächtigen Werkzeug zur Bestimmung von Heterogenitäten von Makromolekülen entwickelt. So wurden erfolgreich die Faltung von Proteinen untersucht [10, 30, 42, 43] wie auch Strukturuntersuchungen an Nukleinsäuren durchgeführt [29, 31, 47, 50].

Aus dem Fluoreszenzlicht lassen sich jedoch mehr Informationen als nur die Intensität gewinnen. So kann man die Lebensdauer der angeregten Zustände bestimmen und die Anisotropie des emittierten Lichts sagt etwas über das räumliche Abstrahlverhalten der Farbstoffe aus. Der Ausbau der Einzelmolekül-FRET-Technik zu einer Multiparameteranalyse wurde Ende der 90er Jahre in den Gruppen von R. Keller [35] und C. Seidel [13, 24, 25, 49] vorangetrieben. Dadurch lassen sich verschiedene Subpopulationen besser voneinander trennen und darüber hinaus werden Abstandsbestimmungen bis hin in den Ångströmbereich ermöglicht [3, 21].

Auf Grund suboptimaler Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen kann es dazu kommen, dass nicht alle Moleküle beide Farbstoffe tragen; ebenso können photophysikalische Effekte dazu führen, dass ein Farbstoff inaktiv ist. Mit klassischen Einzelmolekül-FRET-Messungen ist es kaum möglich zwischen Teilchen zu unterscheiden, die nur mit dem Donor markiert sind, und anderen, bei denen die beiden Farbstoffe zu weit auseinander liegen, als dass ein Energietransfer stattfinden könnte. Gerade bei großen Molekülkomplexen und Proteinen unbekannter Struktur ist es nicht immer gewährleistet, dass sich die Fluorophore in einem geeigneten Abstand zueinander befinden. 2004 haben A. Kapanidis und S. Weiss unter dem Namen *Alternierende Laseranregung* (ALEX, Alternating Laser Excitation) eine Methode vorgestellt, bei der während der Beobachtungszeit eines Moleküls mit zwei Laserlinien beide Farbstoffe abwechselnd direkt angeregt werden [22, 28]. Dadurch kann unabhängig von der Existenz des Donors festgestellt werden, ob der Akzeptor vorhanden ist, d.h. ob es sich um ein doppelt markiertes Molekül handelt.

Ziel dieser Arbeit war die Erweiterung eines vorhandenen Einzelmolekül-FRET-Spektrometers um alternierende Laseranregung. Dazu wurde eine Steuerung aufgebaut, mit der sich die Laserlinien des Donor- bzw. des Akzeptorlasers abwechselnd aktivieren lassen. Die Information des gerade geschalteten Lasers musste mit dem gemessenen

Signal synchronisiert werden, damit für jedes detektierte Photon bekannt ist, durch welche Anregungswellenlänge es ausgelöst wurde. Zudem wurde eine Software geschrieben, welche die ALEX-Rohdaten für die Analyse aufarbeitet. Schließlich wurde das System anhand verschiedener Proben charakterisiert und der Einfluss der verschiedenen Mess- und Analyseparameter auf die Ergebnisse untersucht.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit wesentlichen theoretischen Grundlagen der Fluoreszenz, des Resonanzenergietransfers und der alternierenden Anregung beschrieben.

2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Wenn ein Molekül durch Absorption eines Photons von seinem Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 überführt wird, so gibt es die aufgenommene Energie nach einer gewissen Zeit wieder ab. Wird bei diesem Vorgang ein Photon emittiert spricht man von Fluoreszenz, das entsprechende Molekül wird Fluorophor genannt. Nach dem Franck-Condon-Prinzip findet der Übergang bei Anregung zwischen dem Vibrationsgrundzustand des elektronischen Grundzustands und einem angeregten Vibrationszustand des angeregten elektronischen Zustandes statt. Binnen Femto- bis Picosekunden wird die Vibrationsenergie über Stöße an die umgebenden Moleküle abgegeben und der Fluorophor befindet sich im Vibrationsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustandes. Die Relaxation des angeregten Zustandes S_1 in einen (ebenfalls auf Grund des Franck-Condon-Prinzips) höheren Vibrationszustand des elektronischen Grundzustand S_0 findet innerhalb weniger Nanosekunden statt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist im Vergleich zum absorbierten Licht größer (Stokes-Verschiebung), da ein Teil der aufgenommenen Energie durch die Vibrationsrelaxation in thermische Energie umgewandelt wird.

Fluoreszenz ist nicht die einzige mögliche Form der Relaxation, sondern sie konkurriert mit anderen, strahlungsfreien Relaxationsprozessen. Dies sind insbesondere die interne Konversion (IC) und das so genannte Intersystem Crossing (ISC). Eine Übersicht über die möglichen Übergänge bietet das Jablonski-Termschema in Abbildung 2.1. Bei der internen Konversion wird die Energie des elektronischen Zustandes umgewandelt in höhere Vibrationszustände des elektronischen Grundzustands, beim ISC findet ein Übergang vom Singulett- zum Triplettssystem statt, bei dem es zu einer Spinumkehr kommt (im Singulettssystem sind die Spins der Elektronen entgegengesetzt, im Triplettssystem sind die Spins zweier Elektronen parallel). Der Prozess der Spinumkehr ist klassisch gesehen nicht möglich, die Quantenmechanik jedoch erlaubt diesen „verbotenen“ Übergang. Allerdings sind die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen Singulett- und Triplettssystem sehr gering, so dass Triplettzustände eine hohe Lebensdauer haben. Geht ein Molekül unter Aussendung eines Photons vom Triplettzustand T_1 in den

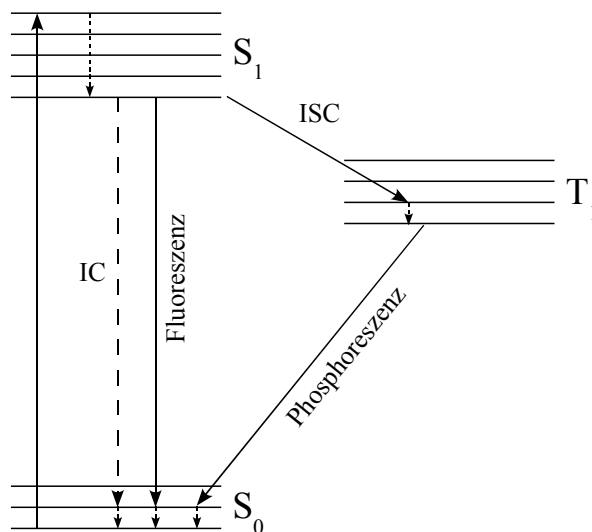


Abbildung 2.1: Das Termschema zeigt den elektronischen Grundzustand S_0 sowie die ersten angeregten Singulett- und Triplettzustände S_1 und T_1 mit einigen Vibrationszuständen. Aus dem angeregten Zustand S_1 kann die Energie als Fluoreszenzphoton oder durch Interne Konversion (IC) abgegeben werden. Zudem kann ein Intersystem Crossing (ISC) vom Singulett- ins Triplettssystem stattfinden. Wird beim Übergang vom Triplett- ins Singulettssystem ein Photon emittiert, spricht man von Phosphoreszenz.

Grundzustand S_0 über, so spricht man von Phosphoreszenz¹.

Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum. In Abbildung 2.2 sind die Absorptions- und Emissionsspektren des in dieser Arbeit verwendeten Donorfärbstoffs Alexa488 und Akzeptorfärbstoffs Alexa594 dargestellt, zusammen mit den Anregungswellenlängen des Donor- und Akzeptorlasers.

Fluoreszenzparameter

Unter der *Quantenausbeute* Φ_F versteht man den Anteil der Fluoreszenzrelaxation an allen möglichen Relaxationsmöglichkeiten. Diese kann durch das Verhältnis der Ratenkonstanten² k_F für die Relaxation durch Fluoreszenz zu sämtlicher Ratenkonstanten

¹Natürlich finden auch strahlende Übergänge von höher angeregten Triplettzuständen T_n zu S_0 statt, ebenso wie es auch innerhalb des Singulettsystems strahlende Übergänge von höheren Anregungen S_n in den Grundzustand gibt. Da diese jedoch eine deutlich geringere Übergangswahrscheinlichkeiten haben, werden sie üblicherweise vernachlässigt

²Ratenkonstanten beschreiben die Wahrscheinlichkeit für eine Reaktion

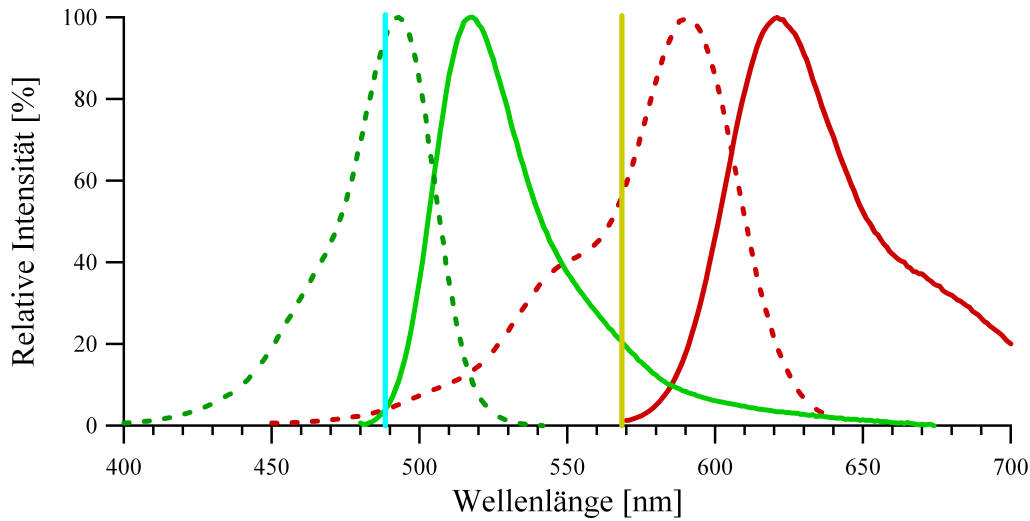


Abbildung 2.2: Absorptions- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (durchgezogene Linien) der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe Alexa488 (grüne Emission) und Alexa594 (rote Emission). Zudem sind die Anregungslinien des Donor- (488 nm) und Akzeptorlasers (568 nm) eingezeichnet.

für alle Relaxationsvorgänge dargestellt werden:

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Fluoreszenzphotonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}. \quad (2.1)$$

Die Zeit, welche der Fluoreszenzfarbstoff statistisch gesehen im angeregten Zustand S_1 bleibt, bezeichnet man als *Lebensdauer* τ_0 . Sie hängt folgendermaßen von den Ratenkonstanten der einzelnen Relaxationsformen ab:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_0} = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}. \quad (2.2)$$

Die Lebensdauer des angeregten Zustandes wird von demjenigen Prozess dominiert, welcher die größte Wahrscheinlichkeit für die Relaxation bietet. Die Quantenausbeute lässt sich auch über die Lebensdauer darstellen:

$$\Phi_F = k_F \tau_0. \quad (2.3)$$

2.2 Theorie des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET)

In Anwesenheit weiterer Fluorophore kann es zu einem zusätzlichen Zerfallskanal kommen, der *Fluoreszenzlöschung*³ Wird ein Farbstoff, der so genannte Donor, angeregt,

³Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass es weitere Prozesse gibt, die zur Fluoreszenzlöschung führen, zum Beispiel chemische Reaktionen des angeregten Zustandes oder Energieübertrag durch Stöße auf andere Moleküle.

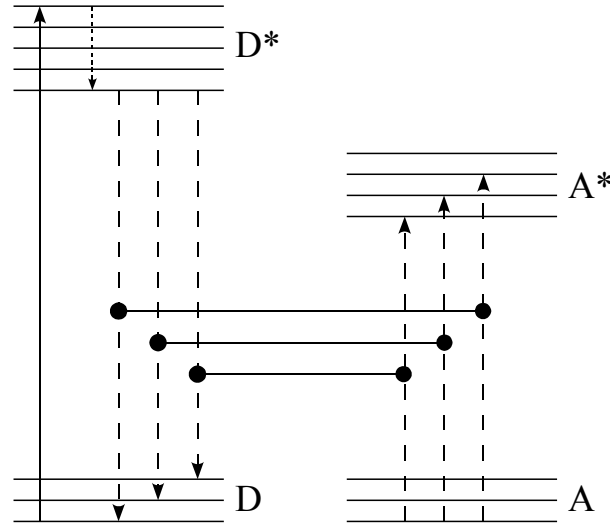


Abbildung 2.3: Beim Förster-Resonanzenergietransfer wird die Anregungsenergie des Donors D strahlungsfrei auf den Akzeptorfarbstoff A übertragen. Das Sternchen markiert jeweils den angeregten Zustand. Adaptiert von [12]

so kann er einen Teil seiner Energie strahlungsfrei auf den zweiten Farbstoff, Akzeptor genannt, übertragen. Dazu müssen sich diese in einem entsprechenden Abstand zueinander befinden (ungefähr 2 bis 10 nm) und das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Diesen Effekt nennt man Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)⁴. Das entsprechende Jablonski-Diagramm ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

2.2.1 FRET-Effizienz E

Im klassischen Bild werden Donor und Akzeptor als schwingende Dipole mit den Dipolmomenten \mathbf{p}_D bzw. \mathbf{p}_A angesehen. Der Donordipol interagiert mit dem elektromagnetischen Feld des einfallenden Lichts und beginnt zu schwingen. Im Nahfeld des Donors, d.h. für Abstände deutlich kleiner als die Wellenlänge des abgestrahlten Lichts, wird das elektromagnetische Feld durch folgende Gleichung beschrieben [20]:

$$\mathbf{E}_D = -\nabla \frac{\mathbf{p}_D \cdot \mathbf{R}}{R} = \frac{\mathbf{p}_D - 3\mathbf{n}(\mathbf{n} \cdot \mathbf{p}_D)}{R^3}. \quad (2.4)$$

Dabei ist $\mathbf{n} = \mathbf{R}/R$ der Einheitsvektor der direkten Verbindung eines Punktes mit dem Ort des Dipols. Dieses Feld wiederum wirkt auf den Dipol des Akzeptors und

⁴Oft findet man in der Literatur auch die Bezeichnung Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer. Dies suggeriert jedoch, dass es bei diesem Vorgang zu Emission und direkt nachfolgenden Absorption eines Fluoreszenzphotons kommt, was nicht der Fall ist. Aus diesem Grund wird im Folgenden die Bezeichnung Förster-Resonanzenergietransfer verwendet.

seine Energie in diesem Feld ist gegeben durch

$$\begin{aligned}
 W_{DA} &= -\mathbf{p}_A \cdot \mathbf{E}_D \\
 &= \frac{\mathbf{p}_A \cdot \mathbf{p}_D - 3(\mathbf{p}_A \cdot \mathbf{n}) \cdot (\mathbf{p}_D \cdot \mathbf{n})}{R^3} \\
 &= \frac{\kappa^2 |\mathbf{p}_A| |\mathbf{p}_D|}{n^2 R^3}
 \end{aligned} \tag{2.5}$$

Im Orientierungsfaktor κ^2 sind alle Winkelterme der Skalarprodukte zusammengefasst. Exakt beschrieben werden kann dieser Vorgang allerdings nur mittels der Quantenmechanik. Die Energietransferrate ist in dieser beschrieben durch Fermis Goldene Regel

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar^2} |\langle \Psi_{D^*} \Psi_A | \hat{W}_{DA} | \Psi_D \Psi_{A^*} \rangle|^2. \tag{2.6}$$

Ψ_D und Ψ_A stehen hierbei für die Wellenfunktionen von Donor bzw. Akzeptor. Das Sternchen markiert das jeweils angeregten Molekül. Der Wechselwirkungsoperator \hat{W}_{DA} ist das quantenmechanische Analogon zur Wechselwirkungsenergie W_{DA} in Gleichung 2.5, die klassischen Dipolmomente \mathbf{p}_A und \mathbf{p}_D werden durch die entsprechenden Operatoren $\hat{\mu}_A$ und $\hat{\mu}_D$ ersetzt. $\hat{\mu}_A$ hängt dabei nur von den räumlichen Koordinaten des Akzeptors und $\hat{\mu}_D$ entsprechend nur von jenen des Donors ab. Gleichung 2.6 kann deshalb faktorisiert werden und man erhält

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar^2} \cdot \frac{\kappa^2}{n^2 R^6} |\langle \Psi_{D^*} | \hat{\mu}_D | \Psi_D \rangle|^2 \cdot |\langle \Psi_A | \hat{\mu}_A | \Psi_{A^*} \rangle|^2. \tag{2.7}$$

$|\langle \Psi_{D^*} | \hat{\mu}_D | \Psi_D \rangle|^2$ beschreibt hierbei die Wahrscheinlichkeit des Donors, vom angeregten in den Grundzustand überzugehen, $|\langle \Psi_A | \hat{\mu}_A | \Psi_{A^*} \rangle|^2$ entsprechend, dass der Akzeptor angeregt wird. Das Produkt dieser Quadrate der Matrixelemente ergibt die Wahrscheinlichkeit für einen resonanten Energietransfer, d.h. dass der Akzeptor angeregt wird bei gleichzeitiger Relaxation des Donors. Der Akzeptorterm ist bestimmt durch das Absorptionsprofil $\epsilon_A(\nu)$, während die Stärke des Donordipols sowohl von seinem Emissionsprofil $\epsilon_D(\nu)$ als auch von der Quantenausbeute Φ_D abhängt:

$$|\langle \Psi_{D^*} | \hat{\mu}_D | \Psi_D \rangle|^2 \propto \int \frac{\epsilon_D(\nu)}{\nu^3} d\nu \cdot \frac{\Phi_D}{\tau_D}, \tag{2.8}$$

$$|\langle \Psi_A | \hat{\mu}_A | \Psi_{A^*} \rangle|^2 \propto \int \frac{\epsilon_A(\nu)}{\nu} d\nu. \tag{2.9}$$

Setzt man diese Beziehungen in Gleichung 2.7 ein, erhält man schließlich

$$k_{ET} \propto \frac{1}{R^6} \cdot \frac{\kappa^2 \Phi_D J}{n^2 \tau_D} \equiv \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6, \tag{2.10}$$

wobei J das spektrale Überlappintegral ist: $J = \int \nu^{-4} \epsilon_A(\nu) \epsilon_D(\nu) d\nu$. Formuliert man Gleichung 2.10 um, indem man $E = k_{ET}/(k_{ET} + k_0)$ setzt, so erhält man die Transferenergie

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}, \tag{2.11}$$

mit

$$R_0 = \left(8,79 \cdot 10^{-28} \text{ mol} \frac{\kappa^2 \Phi_D J}{n^4} \right)^{1/6}. \quad (2.12)$$

R_0 ist unter dem Namen Försterradius bekannt und beschreibt für ein gegebenes Farbstoffpaar den Abstand, in welchem ein Energieübertrag von 50% stattfindet. Er ist von folgenden Faktoren abhängig:

- der Quantenausbeute Φ_D des Donors in Abwesenheit eines Akzeptors,
- dem Brechungsindex n des Mediums,
- dem Überlappintegral J des normalisierten Anregungsspektrums des Akzeptors und des normalisierten Emissionsspektrums des Donors,
- dem Orientierungsfaktor κ^2 . Dieser beschreibt die räumliche Orientierung der Dipole zueinander.

Zur Bestimmung des Orientierungsfaktors κ^2 findet sich eine gute, jedoch sehr formale Abhandlung in [8]. Eine Methode, welche einfacher anzuwenden ist, findet sich in [26]. Bisher gibt es allerdings keine Methode κ^2 zu bestimmen, ohne den Abstand der Fluorophore zu kennen, was natürlich bei FRET-Messungen üblicherweise nicht der Fall ist. Man kann nur Abschätzungen für ein minimales und ein maximales κ^2 machen. Sind beide Fluorophore fest fixiert, so liegt κ^2 zwischen 0 und 4, je nach gegenseitiger Orientierung der Dipole. Sind sie völlig frei beweglich, so ist $\kappa^2 = 2/3$. Üblicherweise wirken sich die Variationen von κ^2 , welche aus den Abschätzungen hervorgehen, jedoch nicht sehr stark auf R_0 aus. Das liegt einerseits daran, dass $R_0 \propto (\kappa^2)^{1/6}$ ist und andererseits durch den Transfervorgang selbst ein weiterer Depolarisierungsfaktor hinzu kommt, welcher κ^2 zusätzlich an $2/3$ annähert. Kommt es dem Experimentator auch weniger auf die exakte Bestimmung des Abstands der beiden Farbstoffe als vielmehr auf qualitative Aussagen an, so behalten diese ihre Gültigkeit, da ein falsch angenommenes κ^2 lediglich eine Verschiebung von R_0 bewirkt und relative Abstände somit erhalten bleiben.

In Abbildung 2.4 ist die Transferenergie E in Abhängigkeit vom Abstand der beiden Farbstoffe aufgetragen. Daran ist auch zu sehen, dass Abstandsmessungen im Bereich des Försterradius' R_0 besonders empfindlich sind, da eine kleine Variation des Donor-Akzeptor-Abstands eine große Änderung der Transferenergie bewirkt. Der Arbeitsbereich für FRET-Messungen ist deshalb üblicherweise auf den Bereich zwischen $0,5 R_0$ und $1,5 R_0$ limitiert. Das in dieser Arbeit verwendete Donor-Akzeptor-Paar Alexa488 und Alexa594 hat einen Försterradius von 60 \AA [18].

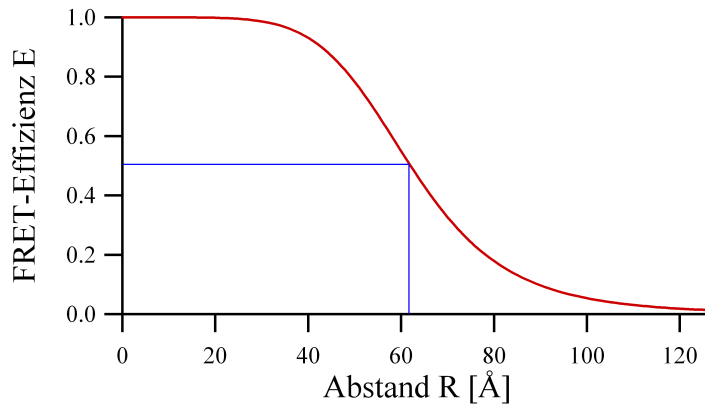


Abbildung 2.4: Abhängigkeit der Transferenergie E vom Abstand der beiden Farbstoffe. Der Försterradius beträgt in diesem Beispiel 62 Å .

Messung der FRET-Effizienz

Fluoreszenzlicht von Donor und Akzeptor werden in getrennten Kanälen detektiert. Betrachtet man die im Donor- bzw. Akzeptorkanal gemessenen Fluoreszenzintensitäten, so lässt sich eine Beziehung für die FRET-Effizienz E gewinnen, mit deren Hilfe sich E aus dem gemessenen Photonenstrom berechnen lässt. Da es immer ein gewissen Überschneiden der Absorptions- und Emissionsspektren der beiden Farbstoffe gibt, müssen die gemessenen Intensitäten der beiden Kanäle korrigiert werden; dies wird in Kapitel 2.2.3 besprochen. Das korrigierte Fluoreszenzsignal pro Farbstoffmolekül im Donorkanal ist

$$F^D = I_0 \varepsilon_D \Phi_D \eta_D (1 - E), \quad (2.13)$$

jenes im Akzeptorkanal ist

$$F^A = I_0 \varepsilon_D \Phi_A \eta_A E. \quad (2.14)$$

Hierbei handelt es sich bei I_0 um die eingestrahlte Laserintensität, ε_D ist der Extinktionskoeffizient des Donors, Φ_D und Φ_A sind die Quantenausbeuten von Donor und Akzeptor, und η_D und η_A die Detektionswahrscheinlichkeiten von Photonen des Donors bzw. Akzeptors in ihren jeweiligen Detektionskanälen.

Betrachtet man das Verhältnis der Intensitäten, so erhält man

$$\frac{F^D}{F^A} = \frac{1}{\gamma \frac{E}{1-E}}. \quad (2.15)$$

Hierbei ist

$$\gamma = \frac{\eta_A \Phi_A}{\eta_D \Phi_D} \quad (2.16)$$

der Detektionsfaktor des Systems. Aufgelöst nach der FRET-Effizienz E ergibt sich für den Energietransfer

$$E = \frac{F^A}{F^A + \gamma F^D}. \quad (2.17)$$

Auf Grund statistischer Effekte misst man nie einen bestimmten Abstand der Fluorophore, sondern erhält stets eine Abstandsverteilung. Aus der Breite der Verteilung kann man jedoch zusätzliche Informationen gewinnen, wie z.B. über eine eventuell vorhandene Dynamik innerhalb der Probe. Ein Verfahren hierzu ist die von Antonik *et al.* entwickelte *Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse* (PDA, Probability Distribution Analysis), welche im Anhang A.1 vorgestellt wird.

2.2.2 Proximity Ratio P

Für den Spezialfall eines Detektionsfaktors $\gamma = 1$ vereinfacht sich Gleichung 2.17 zur so genannten Proximity Ratio P:

$$E_{\gamma=1} = \frac{F^A}{F^A + F^D} \equiv P. \quad (2.18)$$

Im Gegensatz zu E enthält die Proximity Ratio P keine Informationen über Detektionseffizienzen und Quantenausbeuten. Es lassen sich somit nicht explizit Entfernungen zwischen zwei Farbstoffen bestimmen, sondern nur noch relative Abstände. Insbesondere genügt die Betrachtung von P vollauf, wenn es nur auf qualitative Abstandsänderungen ankommt. Im Rahmen dieser Arbeit wird also darauf verzichtet absolute Distanzen anzugeben, vielmehr beschränke ich mich auf relative Abstandsangaben. Dies vereinfacht die Berechnungen, denn die oft sehr mühselige Bestimmung des Detektionsfaktors γ entfällt.

FRET-Effizienz E und Proximity Ratio P sind folgendermaßen miteinander verknüpft:

$$P = \frac{\gamma}{\gamma - 1 + \frac{1}{E}}. \quad (2.19)$$

Diese Beziehung ist in Abbildung 2.5 grafisch dargestellt. Wie in [14] sowie [15] dargestellt, kann die Empfindlichkeit des Systems für einen bestimmten Energietransfer-Bereich möglicherweise durch Variation des Detektionsfaktors erhöht werden.

2.2.3 Korrekturen der Photonenraten

Die Fluoreszenzraten in beiden Detektionskanälen müssen zunächst um mehrere unerwünschte Beiträge korrigiert werden.

Hintergrundrauschen

Vor allem durch Ramanstreuung an den Wassermolekülen, aber auch durch Verunreinigungen des Messpuffers werden unerwünschte Photonen registriert. Zudem werden durch thermische Effekte in den Halbleiterdetektoren Signale produziert, welche

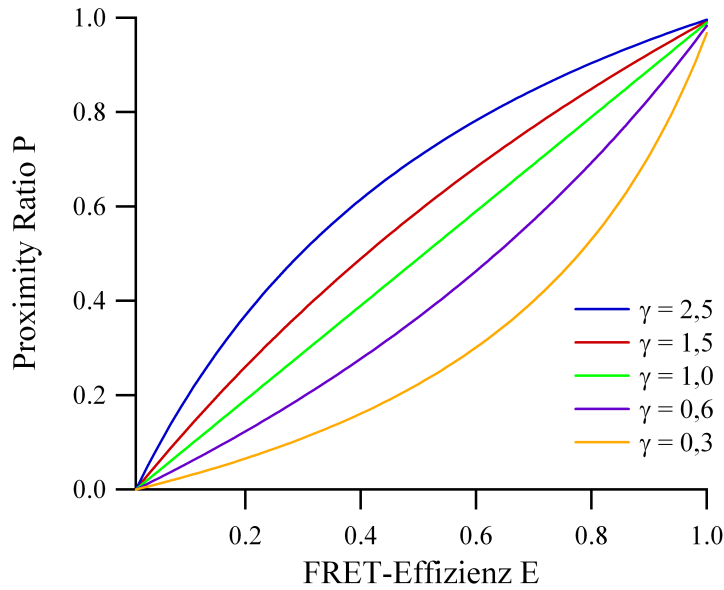


Abbildung 2.5: Die wechselseitige Beziehung von FRET-Effizienz E und Proximity Ratio P für verschiedene Detektionsfaktoren γ .

fälschlicherweise als eintreffende Photonen gewertet werden. Dieses Hintergrundrauschen ist im allgemeinen für beide Detektionskanäle verschieden und hängt von der eingestrahlten Wellenlänge und den verwendeten Filtern ab. Dies führt zu leicht erhöhten Zählraten in beiden Kanälen. Mittels einer Autokorrelationsmessung lässt sich feststellen, ob es fluoreszierende Teilchen im Puffer gibt. Am Einzelmolekülrechner wird eine Messung von reinem Puffer mit dem Programm FRETtchen [14] analysiert und die mittlere Rate des Hintergrundrauschens bestimmt.

Übersprechen von Donoremission in den Akzeptorkanal

Aufgrund des Schwanzes im Emissionsspektrum des Donors zu längeren Wellenlängen hin (zu sehen in Abbildung 2.2) kommt es dazu, dass im Akzeptorkanal auch Photonen aufgenommen werden, welche von Fluoreszenz des Donors herrühren. Dies äußert sich darin, dass eine nur mit dem Donorfarbstoff markierte Probe eine scheinbare FRET-Effizienz größer als Null hat. Dieser Effekt lässt sich durch einen Korrekturfaktor in der Auswertesoftware ausgleichen, der eine entsprechende Anzahl Photonen im Akzeptorkanal abzieht. Der Korrekturfaktor für das Übersprechen wird so gewählt, dass eine D_{only} -Probe die FRET-Effizienz $E = 0$ hat.

Direkte Anregung des Akzeptors

Auf Grund eines breiten Anregungsspektrums des Akzeptors gibt es eine nicht zu vernachlässigende Wahrscheinlichkeit, dass dieser vom Donorlaser direkt angeregt wird, was ebenfalls dazu führt, dass eine zu hohe FRET-Effizienz gemessen wird. Unter Einzelmolekülbedingungen kann die direkte Anregung mit einer doppelt markierten Probe, welche keinen FRET zeigt, bestimmt werden. Nachdem das Signal für das Übersprechen und für den Hintergrund korrigiert wurde, ist die Verschiebung des Maximums der P-Verteilung von Null ein Maß für die direkte Anregung.

2.3 Alternierende Laseranregung

Bei herkömmlichen FRET-Messungen werden die Fluorophore nur mit einer Wellenlänge angeregt, der Donor direkt, der Akzeptor indirekt durch resonanten Energietransfer vom Donor. Zusätzlich zu den in Kapitel 2.2.3 genannten Einflüssen auf die Messdaten ergeben sich weitere Einschränkungen für die quantitative Analyse molekularer Wechselwirkungen.

Für die Reaktion eines akzeptormarkierten Makromoleküls mit einem donormarkierten Liganden, $M^A + L^D \rightleftharpoons M^A L^D$, ergeben sich dadurch folgende Probleme:

1. Bei Einzelmolekül-FRET-Messungen erhält man nur bei genügend kleinen Donor-Akzeptor-Abständen ein messbares Signal (üblicherweise bei $R_{D-A} < 6 - 8$ nm, abhängig vom Försterradius R_0 des verwendeten Farbstoffpaars). Dadurch lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob es sich bei dem gemessenen Teilchen um einen doppelt markierten $M^A L^D$ -Komplex handelt, bei dem die Farbstoffe für Energietransfer zu weit auseinander sind, oder ob es sich um einen freien L^D handelt. Die Bedingung, dass die Fluorophore immer innerhalb eines bestimmten Abstandes zueinander sind, ist insbesondere bei großen Komplexen oder interagierenden Proteinen von unbekannter Struktur nicht gewährleistet.
2. Fehlt der Akzeptor oder befindet er sich in einem inaktiven Zustand, z.B. wenn dieser durch Photobleichen zerstört wurde, liegt ein $M L^D$ -Komplex vor, welcher dasselbe Verhalten zeigt wie L^D . Dies führt zu einem scheinbaren Anstieg der Konzentration von freien L^D -Molekülen.
3. Es werden keine akzeptormarkierten Moleküle M^A detektiert. Denn um ein geringes Übersprechen zu erhalten, wird der Akzeptorfarbstoff so gewählt, dass er nur minimal durch den Donor-Laser direkt angeregt wird.
4. Eine andere Stöchiometrie der Farbstoffe als 1:1 (z.B. $M^A [L^D]_2$) kann durch herkömmliche Einzelmolekül-FRET-Messungen nicht festgestellt werden, der entsprechende Energietransfer wird im Allgemeinen misinterpretiert.

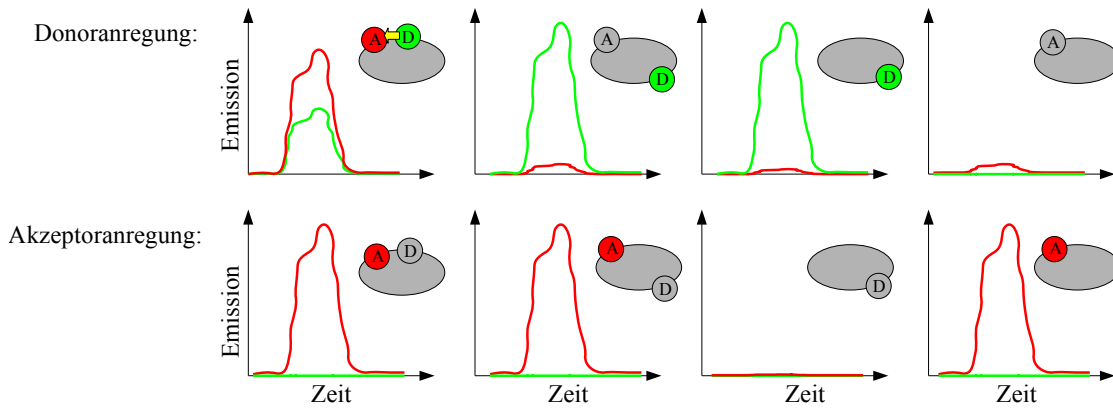


Abbildung 2.6: Emission einer FRET-aktiver Probe, einer NoFRET-, einer D_{only} - und einer A_{only} -Probe bei Donor- bzw. Akzeptoranregung. Eine Unterscheidung von NoFRET- und D_{only} -Probe ist bei Donoranregung nicht möglich, bei Akzeptoranregung emittiert der Akzeptorfarbstoff der NoFRET-Probe, während man bei einer D_{only} -Probe kein Signal misst. In Anlehnung an [22].

Um diese Einschränkungen zu umgehen wurde 2004 von A. Kapanidis und S. Weiss die Technik der alternierenden Laseranregung entwickelt [22]. Dabei werden beide Farbstoffe im Fokus abwechselnd direkt angeregt, der Donor vom Donor-Laser und der Akzeptor vom Akzeptor-Laser. Dadurch kann die Existenz eines aktiven Akzeptors festgestellt werden und somit zwischen einer doppelt markierten NoFRET-Probe und einer nur mit dem Akzeptor versehenen Probe unterschieden werden. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 2.6 anhand der unterschiedlichen Emissionen bei Anregung mit dem Donor- und Akzeptorlaser für eine FRET-aktive Probe, für eine NoFRET-, für eine D_{only} - und für eine A_{only} -Probe aufgezeigt. Während das Signal einer NoFRET- und einer D_{only} -Probe bei Donoranregung nahezu identisch ist, unterscheidet es sich deutlich bei Akzeptoranregung. Bei Anregung mit dem Akzeptorlaser können A_{only} -Moleküle detektiert werden, was jedoch mit dem Donorlaser nicht möglich ist.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass fast zur gleichen Zeit die Gruppe um D. Lamb ein sehr ähnliches Konzept unter dem Namen PIE (für *Pulsed Interleaved Excitation*) vorgestellt hat [33]. Bei PIE werden die Fluorophore allerdings mit Laserpulsen im Nanosekundenbereich angeregt.

2.3.1 Proximity Ratio P und Stöchiometriefaktor S

Bei der alternierenden Anregung kann man nun zwei Größen bestimmen, die FRET-Effizienz E , welche eine Aussage über den Abstand des Donor- und Akzeptorfarbstoffs R_{D-A} innerhalb des $M^A L^D$ -Komplexes macht, und ein abstandsunabhängiges Maß für die Stöchiometrie, den Stöchiometriefaktor S . Dieser bietet wichtige Informationen auch dann, wenn der Abstand der beiden Farbstoffe zu groß ist, um E zu bestimmen. S er-

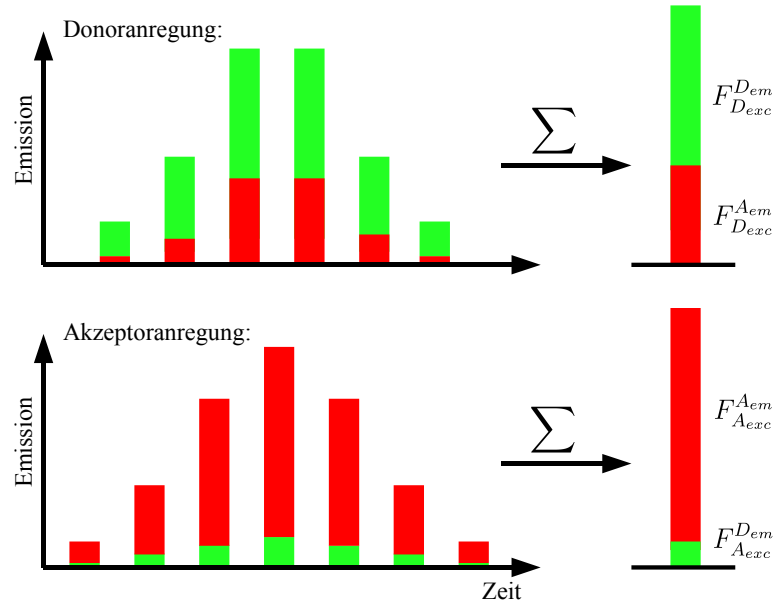


Abbildung 2.7: Der zeitliche Verlauf der Emission von Donor (grün) und Akzeptor (rot) beim Durchgang eines Teilchens durch den Fokus. Durch die alternierende Anregung werden Donor und Akzeptor abwechselnd direkt angeregt. Für einen Burst werden die emittierten Photonen der einzelnen Perioden addiert (rechte Darstellung). In Anlehnung an [22].

laubt eine thermodynamische und kinetische Bestimmung von Interaktionen der an der Reaktion beteiligten Stöchiometrie und eine Untersuchung der lokalen Umgebung mittels Messung von Schwankungen der Helligkeit des Farbstoffs [22]. Für die Strukturbestimmung mittels E wird die Information während der Donor-Laser-Anregung verwendet, für Informationen über die Stöchiometrie werden sowohl Anregungsphasen des Donor- als auch des Akzeptorlasers betrachtet. Berücksichtigt man die FRET-Effizienz E und den Stöchiometriefaktor S , so kann man mit beiden Farbstoffen versehene von einfach markierten Proben trennen und so zu präziseren Abstandsverteilungen gelangen.

Während ein einzelner Molekülkomplex durch das Detektionsvolumen diffundiert, wird mehrmals zwischen Donor- und Akzeptoranregung alterniert. Das detektierte Signal wechselt also mit der Alternierungsperiode zwischen Donor-Anregung (FRET) und Akzeptoranregung (kein FRET), wie es in Abbildung 2.7 skizziert ist. f_{Dexc}^{Dem} bezeichnet die Donor-, f_{Dexc}^{Aem} die entsprechende Akzeptoremission je Donoranregungsintervall. Ein Fluoreszenzausbruch (*Burst*) setzt sich zusammen aus den detektierten Photonen einer Reihe aufeinanderfolgender alternierender Perioden. Das Gesamtsignal eines Bursts während der Donoranregung setzt sich also zusammen aus der Summe der detektierten

Photonen der einzelnen Donorpulse:

$$F_{D_{exc}}^{Dem} = \sum f_{D_{exc}}^{Dem}, \quad F_{D_{exc}}^{Aem} = \sum f_{D_{exc}}^{Aem}. \quad (2.20)$$

Entsprechend den Ausführungen in Kap. 2.2.1 kann hiermit eine Aussage über den Abstand von Donor und Akzeptor für das entsprechende Molekül getroffen werden, indem die FRET-Effizienz berechnet wird:

$$E = \frac{F_{D_{exc}}^{Aem}}{F_{D_{exc}}^{Aem} + \gamma F_{D_{exc}}^{Dem}}, \quad (2.21)$$

wobei γ der in Gleichung 2.16 definierte Detektionsfaktor ist.

Werte für E liegen im Intervall $[0;1]$. Sehr geringe Werte erhält man bei Molekülen, welche nur mit einem Donor markiert sind oder wenn der Abstand von Donor und Akzeptor $R_{D-A} \gg R_0$ ist. Für $R_{D-A} > R_0$ erhält man niedrige Werte und für $R_{D-A} < R_0$ hohe Werte.

Der Akzeptor-Laser regt den Akzeptor direkt an, während der Donor auf Grund seines Anregungsspektrums (Abbildung 2.2) davon nicht betroffen ist. Analog zu den Donor-Anregungs-Observablen (Gleichung 2.20) definiert man die Donor- und Akzeptoremissionen pro Anregungsperiode durch den Akzeptorlaser, $f_{A_{exc}}^{Dem}$ bzw. $f_{A_{exc}}^{Aem}$, und ihre Emissionen innerhalb eines einzelnen Ausbruchs

$$F_{A_{exc}}^{Aem} = \sum f_{A_{exc}}^{Aem}, \quad F_{A_{exc}}^{Dem} = \sum f_{A_{exc}}^{Dem}. \quad (2.22)$$

Fasst $F_{D_{exc}} = F_{D_{exc}}^{Aem} + \gamma F_{D_{exc}}^{Dem}$ die gesamte Emission während der Donoranregung zusammen und $F_{A_{exc}} = F_{A_{exc}}^{Aem} + F_{A_{exc}}^{Dem}$ diejenige bei Einstrahlung des Akzeptorlasers, so definiert man S_γ als

$$S_\gamma = \frac{F_{D_{exc}}}{F_{D_{exc}} + F_{A_{exc}}}. \quad (2.23)$$

Analog zur Argumentation für die Proximity Ratio P in Kapitel 2.2.2 wird im Allgemeinen der Stöchiometriefaktor S betrachtet, bei dem $\gamma = 1$ gesetzt ist. Der Vollständigkeit halber seien hier die Gleichungen für die Proximity Ratio P und die des Stöchiometriefaktors S noch einmal angegeben:

Die Proximity Ratio:

$$P = \frac{F_{D_{exc}}^{Aem}}{F_{D_{exc}}^{Aem} + F_{D_{exc}}^{Dem}}. \quad (2.24)$$

Der Stöchiometriefaktor S :

$$S = \frac{F_{D_{exc}}^{Aem} + F_{D_{exc}}^{Dem}}{F_{D_{exc}}^{Aem} + F_{D_{exc}}^{Dem} + F_{A_{exc}}^{Aem}}. \quad (2.25)$$

Die Größe $F_{A_{exc}}^{Dem}$ ist im Allgemeinen vernachlässigbar klein und wurde in Gleichung 2.25 nicht mehr berücksichtigt.

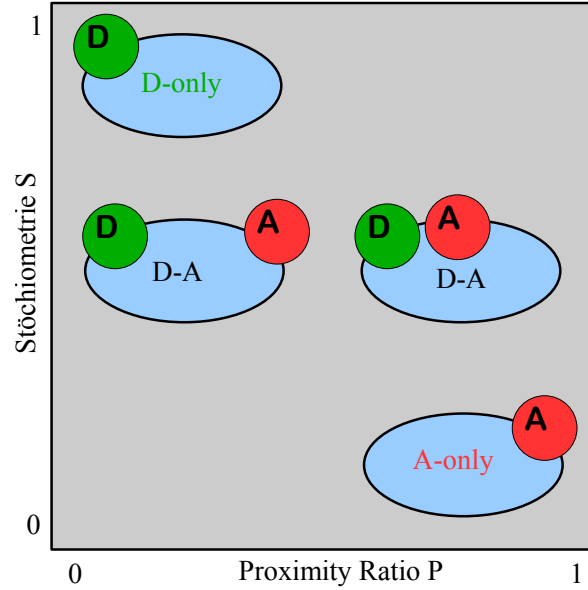


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Positionen der einzelnen Spezies im P-S-Diagramm. In Anlehnung an [22].

Auch die Werte von S liegen im Intervall $[0;1]$. S ist jedoch abhängig vom Verhältnis der Anregungsintensitäten der beiden Laser. Um einfach und doppelt markierte Proben möglichst gut voneinander trennen zu können, sollten die Intensitäten so eingestellt werden, dass S für eine doppelt markierte Probe $\sim 0,5$ ist. Ist das System in diesem Sinne eingestellt, erhält man für nur mit dem Donor markierte Proben (D_{only} -Proben) einen hohen S -Wert von ≈ 1 (da $F_{A_{exc}} = 0$), für nur mit dem Akzeptor versehene Proben (A_{only} -Probe) einen niedrigen Wert zwischen 0 und 0,2 (wegen niedrigem $F_{D_{exc}}$) und für doppelt markierte Proben S -Werte im mittleren Bereich (0,3 bis 0,8). Möchte man Proben unterschiedlicher Stöchiometrie (z.B. bei Anwesenheit von mehr als einem Akzeptor) trennen, sollten die Intensitäten so eingestellt werden, dass eine möglichst gute Trennung der einzelnen Spezies erfolgt.

Die Darstellung der Messdaten erfolgt in zweidimensionalen P-S-Diagrammen, und ist in Abbildung 2.8 skizziert. Auf diese Weise kann man auf einen Blick erkennen, welche Ereignisse von doppelt markierten Teilchen herrühren und welche von Proben stammen, die nur einen Farbstoff tragen. Nur mit dem Donor markierte Proben werden in der linken oberen Ecke dargestellt, da sie einen hohen S -Wert, aber keinen Energietransfer zeigen. A_{only} -Proben befinden sich in der unteren rechten Ecke, sie haben einen geringen S -Wert, aber eine scheinbar hohe FRET-Effizienz, welche von der direkten Anregung durch den Donorlaser herrührt. Sind beide Farbstoffe vorhanden, liegen

die S-Werte im mittleren Bereich, die Proximity Ratio verteilt sich entsprechend dem Abstand der Fluorophore. Experimentell ermittelte P-S-Diagramme zu diesen Spezies sind in Kapitel 5.1 präsentiert.

Möchte man wie bisher ein Histogramm der Proximity Ratio erhalten, bildet man die Projektion der zweidimensionalen Daten des P-S-Diagramms auf den P-Raum. Bei der alternierenden Laseranregung bietet sich nun der Vorteil, dass man einen bestimmten Bereich des S-Raums auswählen kann, welcher für das Histogramm der Proximity Ratio verwendet werden soll. Dadurch lassen sich FRET-aktive Proben effektiv von einfach markierten Proben trennen und nur noch diese bei der Verteilung der Proximity Ratio berücksichtigen. Durch Projektion auf den S-Raum erhält man eine Verteilung der Stöchiometriefaktoren. Mit Hilfe dieses Diagramms lässt sich ein passenden Bereich des S-Raums auswählen, aus dem das P-Histogramm gebildet werden soll. Siehe hierzu auch das Kapitel der Softwarebeschreibung ab Seite 31 sowie den Anhang A.2.

Abhängig von der Art der Probe und der Zielsetzung des Experiments sind unterschiedliche Anregungssequenzen sinnvoll. In dieser Arbeit werden Anregungssequenzen mit einer Viererfolge von Zeitdauern bezeichnet, nämlich $T_{Donor} - T_{Pause} - T_{Akzeptor} - T_{Pause}$. Die Sequenz 200–25–50–25 steht also für eine 200 μs lange Donoranregung, eine 50 μs lange Akzeptoranregung und jeweils einer Pause von 25 μs zwischen den Anregungspulsen. Der Einfluss der Anregungssequenz auf die Ergebnisse wird in Kapitel 5.4.2 diskutiert.

2.3.2 Unabhängigkeit von P und S

Dass E und S unabhängige Observablen sind, wird im Folgenden dargelegt. Unter Donor-Anregung mit der Intensität $I_{D_{exc}}$, bei einer Wellenlänge, bei der der Donor den Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{D_{exc}}$ hat, werden die folgenden Fluoreszenzsignale aufgezeichnet:

$$F_{D_{exc}}^{D_{em}} = I_{D_{exc}} \varepsilon_{D_{exc}} \Phi_D \eta_D (1 - E) \quad \text{und} \quad F_{D_{exc}}^{A_{em}} = I_{D_{exc}} \varepsilon_{D_{exc}} \Phi_A \eta_A E \quad (2.26)$$

Setzt man dies zusammen mit der Definition des Detektionsfaktors $\gamma = \eta_A \Phi_A / \eta_D \Phi_D$ in $F_{D_{exc}} = F_{D_{exc}}^{A_{em}} + \gamma F_{D_{exc}}^{D_{em}}$ ein, so erhält man

$$F_{D_{exc}} = I_{D_{exc}} \varepsilon_{D_{exc}} \Phi_A \eta_A. \quad (2.27)$$

Hieran sieht man, dass $F_{D_{exc}}$ unabhängig von E ist. Da der Stöchiometriefaktor S ein Ausdruck von $F_{D_{exc}}$ und $F_{A_{exc}}$ ist, ist er ebenfalls unabhängig von E, und damit auch unabhängig vom Abstand R_{D-A} . Die Proximity Ratio P ist nur ein Spezialfall von E, bei dem $\gamma = 1$ ist. Deshalb ist S offensichtlich auch unabhängig von P.

3 Das Einzelmolekülspektrometer mit alternierender Laseranregung

Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau des Einzelmolekülspektrometers ist im Laufe der Dissertation von Alexander Gansen [14] entstanden und von mir in einigen Punkten erweitert worden. Intention des Designs war es, eine möglichst große Flexibilität in Bezug auf die Erweiterbarkeit zu erreichen und damit viele verschiedene Messmethoden in einem Aufbau zu ermöglichen. Dazu gehörten insbesondere die getrennte Einkopplung mehrerer Laser, um Mehrfarbexperimente durchführen zu können.

Momentan stehen folgende Laser zur Verfügung: Ein Argon-Krypton-Laser mit den Linien 488, 568 und 647 nm (643-RYB-A02, Melles Griot), ein gepulster Nd:YLF-Laser mit 532 nm (GE-100, Time-Bandwidth Products) sowie zwei Diodenlaser mit 470 bzw. 635 nm (LDH 470 bzw. LDH 635, PicoQuant GmbH). Um mit diesem Aufbau Experimente mit alternierender Laseranregung durchführen zu können, waren zusätzliche Erweiterungen nötig, auf die in Kapitel 3.2 eingegangen wird.

3.1 Das Einzelmolekülspektrometer

3.1.1 Der optische Aufbau

Bis auf den 470 nm Diodenlaser werden alle Laser mit Einmoden-Lichtleitern in das System eingekoppelt. Dadurch ist ein Strahlprofil ohne höhere Harmonische gewährleistet. Durch das stark elliptische Strahlprofil der 470 nm-Diode würden bei Einkopplung in eine Glasfaser ungefähr 50% der Intensität verloren gehen; da dieser Laser ohnehin nur eine geringe Ausgangsleistung von ca. 1 mW hat, würde dies den sinnvollen Einsatz bei Einzelmolekülmessungen stark einschränken. Deshalb wird dieser Laser über einen Klappspiegel in das Mikroskop eingekoppelt.

Die Linien des Argon-Krypton- und des Nd:YLF-Lasers teilen sich dieselbe Glasfaser; die jeweils gewünschte Linie wird mittels eines akustooptischen Modulators (AOM, Modell AOTFnC-VIS-TN von AA Optoelectronics) ausgewählt. Bei diesem wird eine Schallwelle durch einen Kristall gesendet, wobei sich Dichteschwankungen im Kristallmedium ergeben. Diese Dichteschwankungen bewirken für das einfallende Licht einen ähnlichen Effekt wie ein optisches Gitter, sodass das Licht gebeugt wird. Für jede Laserlinie werden Frequenz und Leistung der Schallwelle so eingestellt, dass das erste Maximum des Beugungsbildes maximale Intensität hat; dieses wird in die Glasfaser eingekoppelt. Es lassen sich die optimalen Einstellungen für bis zu acht Laserlinien in

der Steuereinheit des AOM speichern. Durch verschiedene Frequenzen der Schallwelle ist es möglich, unterschiedliche Laserlinien auszuwählen und in die Faser einzukoppeln. Die eingekoppelte Laserlinie und deren Intensität lassen sich auch extern steuern. Dem AOM kommt eine Schlüsselrolle bei der alternierenden Anregung zu, wie in Kapitel 3.2 ausführlich erläutert wird.

Abbildung 3.1 bietet einen Überblick der Mikroskopeinheit. Jede Einkopplung hat ihre eigene Teleskopeinheit zur Strahlaufweitung. Diese besteht jeweils aus einem Linsenpaar, wobei die erste Linse fixiert ist. Durch Bewegen der zweiten Linse kann auf diese Weise die Strahldivergenz angepasst werden. Haben die achromatischen Linsen Brennweiten von f und f' , so ergibt sich eine Vergrößerung von $M = f/f'$. Um den Platzbedarf bei starker Vergrößerungen gering zu halten, ist die Teleskopeinheit nach Art eines Galileischen Fernrohrs aufgebaut, das aus einer Sammellinse und einer Zerstreuungslinse besteht.

Hinter den Teleskopeinheiten befindet sich jeweils ein Paar von Spiegeln, mit welchem der Verlauf der Strahlen in x- und y-Richtung verschoben werden kann, ohne dass der Durchlauf durch das Linsensystem des Teleskops dadurch beeinträchtigt wird. Damit ist eine komfortable und präzise Einkopplung der Strahlen in den Mikroskopkörper möglich. Mittels des Strahlteilers DC1 werden sämtliche Laserlinien zusammengeführt und über den Strahlteiler DC2 zum Objektiv geführt. Um eine hohe Fluoreszenzausbeute zu erreichen muss der Strahlteiler DC2 ein enges Reflexionsprofil haben; so sollen die Anregungswellenlängen 488 und 568 nm möglich gut reflektiert werden, um eine hohe Anregungsleistung zu erreichen. Gleichzeitig sollen Fluoreszenzphotonen ohne Verlust transmittiert werden. Diese Anforderungen erfüllt ein Dual-Notch-Filter (BrightLine FF498/581-Di01-22-D, Semrock), der sehr schmale Reflexionsbanden bei gleichzeitig hohen Transmissionswerten anderer Wellenlängen aufweist.

Die Farbstoffe emittieren Photonen in alle Raumrichtungen. Dasselbe Objektiv, das auch das Anregungslicht in die Probe fokussiert, sammelt ungefähr 25% aller Photonen, was einem Akzeptanzwinkel des Objektivs von π entspricht. Diese passieren den dichroitischen Strahlteiler DC2, welcher von Rayleighstreuung herrührende Photonen effektiv unterdrückt. Ein Achromat fokussiert das Detektionslicht auf eine Lochblende, wodurch jegliches Licht, welches nicht im Laserfokus entstanden ist, herausfiltert wird (siehe Abbildung 3.2). Das Fluoreszenzlicht wird nun in zwei spektrale Bereiche getrennt, welche durch den Strahlteiler DC3 (600DCXR, Omega Optical) und durch Emissionsfilter (520DF40 für den Donorkanal, 610ALP für den Akzeptorkanal, beide Omega Optical) festgelegt und auf die verwendeten Farbstoffe abgestimmt sind. Durch Linsen wird das Licht auf zwei Avalanche-Photodioden (APD, PerkinElmer Optoelectronics) fokussiert, welche fähig sind einzelne Photonen zu detektieren. Für jedes erkannte Photon geben sie ein logisches Signal aus, welches über einen Router (PRL400) an die TCSPC¹-Messkarte TimeHarp200 (beides von PicoQuant GmbH) ge-

¹TCSPC steht für Time Correlated Single Photon Counting. Das bedeutet, dass mit dieser Messkarte die exakte Ankunftszeit einzelner Photonen in Bezug auf ein Synchronisationssignal (SYNC) registriert werden kann.

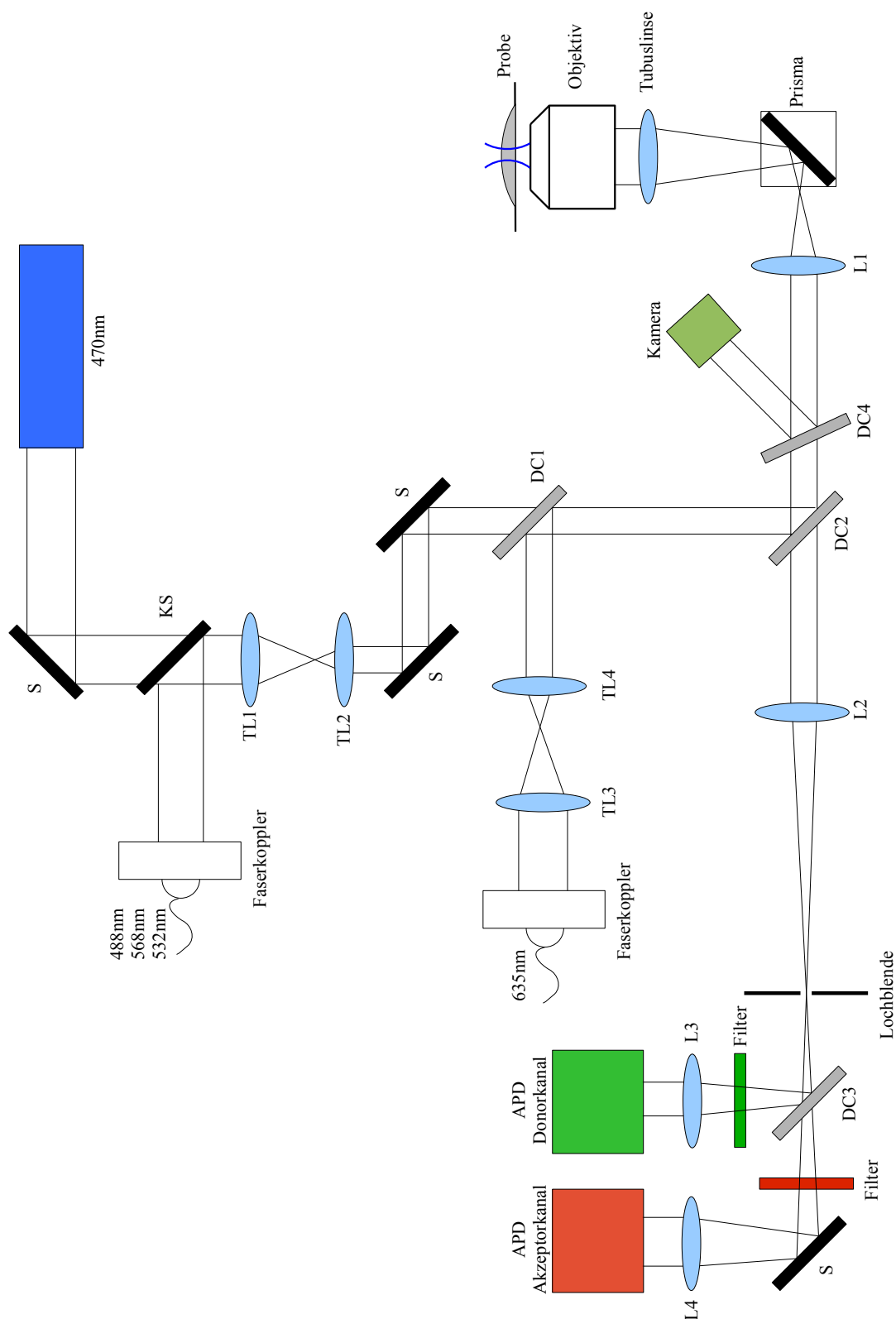


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Mikroskopieeinheit. Der 470 nm-Laser wird über einen Klappspiegel eingekoppelt, alle anderen Laserlinien über Glasfaserkoppler. **S:** Spiegel, **KS:** Klappspiegel, **Lx:** Linse, **TLx:** Teleskoplinse, **DCx:** Strahlteiler, **APD:** Avalanche-Photodiode.

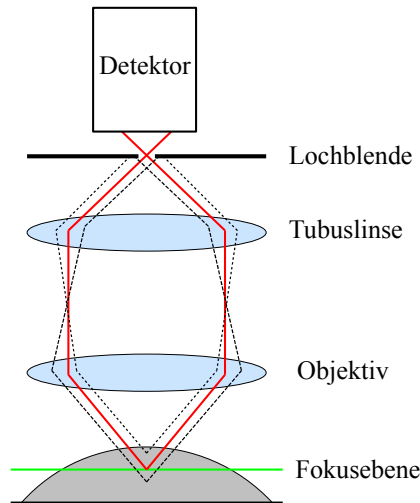


Abbildung 3.2: Das konfokale Prinzip bei der Detektion: Durch die Lochblende in der Bildebene wird Streulicht effektiv unterdrückt und nur im Fokus emittierte Photonen werden detektiert.

leitet wird. Ein zusätzliches Synchronisationssignal (SYNC) wird von einem Pulsgeneratormodul der Kontrolleinheit für die Diodenlaser (PDL 808, PicoQuant GmbH, wird bei cw-Anregung verwendet) oder einem gepulsten Laser bereit gestellt. Die Signale der Detektoren werden zunächst mittels eines Constant Fraction Discriminator (CFD) gefiltert, der Signale unterhalb einer gewissen Schwelle verwirft. Zum Detektionszeitpunkt eines Photons wird ein Schaltkreis aktiviert, in dem linear zur verstrichenen Zeit eine Spannung bis zum folgenden SYNC-Signal ansteigt. Diese Spannung wird dann zum Eintreffzeitpunkt des Photons umgerechnet.

3.1.2 Erweiterungen und technische Verbesserungen

Ausgehend vom in [14] beschriebenen Aufbau des Einzelmolekül-FRET-Spektrometers wurden im Rahmen dieser Arbeit die folgenden Veränderungen vorgenommen. Ziel war einerseits, ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis zu erlangen, andererseits die Handhabung des Systems zu vereinfachen.

Austausch des Prismas im Mikroskop

Bisher hatte das Okular des Mikroskops zwei Aufgaben: Einerseits wurde mit ihm überprüft, ob der Anregungsstrahl senkrecht zum Probenträger einfiel, andererseits ob der Laserfokus überhaupt innerhalb des Messvolumens positioniert war. Dafür wurden im Mikroskop 20% der Fluoreszenzintensität durch ein Prisma in das Okular geleitet. Dieses Prisma wurde durch eines ersetzt, welches das Licht vollständig reflektiert.

Die Aufgabe des Okulars übernimmt nun eine Minikamera (V-Security.de, Mini Überwachungskamera Color mit Knopfobjektiv und Ton). Ein Strahlteiler (Thorlabs BSF10-A1), welcher im Winkel von ca. 20° nur 3% der Intensität auf den CMOS-Chip der Kamera abbildet, ist zwischen der Linse L1 und dem Strahlteiler DC2 in den Lichtweg eingebaut. Durch diesen Umbau wird insgesamt ein um etwa 17% stärkeres Fluoreszenzsignal erreicht.

Austausch der Halterung für den Dichroiten

Bisher war es immer mit einem hohen Justageaufwand verbunden, wenn der Dichroit DC2 gegen einen anderen ersetzt werden musste; dies ist immer dann nötig, wenn eine andere Laserlinie für die Anregung verwendet wird. Die Reflexion des Anregungsstrahls an diesem Strahlteiler bedarf einer hohen Präzision; schon geringe Unterschiede im Winkel verursachen, dass man den gesamten Strahlengang zum Mikroskop und zu den Detektoren neu justieren muss. Die verschiedenen Dichroite lagen bisher in unterschiedlichen Fassungen vor, welche durch eine Madenschraube in der Halterung fixiert wurden. Dadurch war die Fixierung nicht reproduzierbar und ein Austausch des Strahlteilers ohne anschließende Neujustage bisher unmöglich.

Deshalb wurde eine Halterung entwickelt, bei welcher der Strahlteiler DC2 ohne Fassung direkt mit der reflektierenden Oberfläche an einen Ring angepresst wird. Dadurch ist jederzeit gewährleistet, dass die Position der reflektierenden Fläche exakt dieselbe ist.

Die Firma Thorlabs fertigte eine modifizierte Version der Fassung KM100/B an. Anstatt der Standardschrauben besitzt diese nun die Differenzialschrauben DAS110, welche eine extrem feine Justage ermöglichen. Pro Umdrehung der Schraube verschiebt sich der Bolzen um nur $25\text{ }\mu\text{m}$, was einer Verkipfung der Dichroiten um $600\text{ }\mu\text{rad}$ entspricht. In die 6,35 mm dicke Frontplatte wurde eine Bohrung mit 22,3 mm Durchmesser und 5,4 mm Tiefe eingebracht und eine weitere konzentrische mit einem Durchmesser von 19 mm, sodass ein etwa 1,5 mm breiter Anpressring an der Rückseite für den Strahlteiler entstand. In die äußere Bohrung wurde ein Gewinde geschnitten, durch das die Strahlteiler mit 22 mm Durchmesser mittels eines Fixierrings gegen den Anpressring gedrückt werden können. Zum einfachen Einsetzen des Fixierrings kann man ein dafür zugeschnittenes Werkzeug verwenden.

Gemeinsame Nutzung der Laser mit dem FFM

Ein weiterer Nachteil in der Handhabung des Mikroskops bestand darin, dass das Einzelmolekülspektrometer und das Fluoreszenz-Fluktuations-Mikroskop (FFM) dieselben Laser nutzen, jedoch nur exklusiv, d.h. dass immer nur an einem Gerät zur gleichen Zeit gemessen werden konnte. Diesen Mangel wurde behoben, indem auf dem La-

sertisch für den Ar-Kr-Laser ein Strahlteiler installiert wurde, der ungefähr 70% des Lichts transmittiert und 30% reflektiert. Bei Autokorrelationsmessungen mit dem FFM benötigt man keine so hohe Laserintensität wie bei Einzelmolekülmessungen. Damit für jedes Mikroskop unabhängig die Anregungswellenlänge gewählt werden kann, verfügt nun jedes über einen eigenen AOM.

Der grüne Laser wird nicht über einen Strahlteiler auf das Einzelmolekülmikroskop und das FFM verteilt, da diese Anregungslinie bisher nicht von beiden Geräten gleichzeitig genutzt wurde. Bei Bedarf kann sie über einen Klappspiegel ins FFM eingekoppelt werden.

Aufweitung der Fokusgröße

Im Gegensatz zu konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen, welche zur Bildgebung verwendet werden und wo man der Auflösung wegen einen möglichst kleinen Fokus haben möchte, ist es bei FRET-Messungen von Vorteil, ein möglichst großes Fokalsvolumen zu haben. Dessen Größe hängt von der numerischen Apertur NA des verwendeten Objektivs ab. Für einen nicht-divergenten Laserstrahl, welcher die hintere Fokalapertur (BFA, back focal aperture) des Objektivs gleichmäßig beleuchtet, erhält man den Radius ω_0 des Fokus

$$\omega_0 = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (3.1)$$

wobei λ die Wellenlänge des Lasers ist. $NA = n \cdot \sin(\alpha)$ ist die numerische Apertur des Objektivs, n der Brechungsindex des umgebenden Mediums und α der halbe objektseitige Öffnungswinkel ist. Für ein gaussförmiges Strahlprofil ist diese Gleichung gültig, wenn die BFA so beleuchtet wird, dass der $1/e^2$ -Strahldurchmesser ungefähr dem doppelten Durchmesser der BFA entspricht. Die effektive numerische Apertur kann für den anregenden Strahl künstlich verkleinert werden, indem ein geringerer Teil der BFA beleuchtet wird [2].

Linse L1 (Brennweite 50 mm) und die Tubuslinse bilden ein Teleskop. Ersetzt man die bisherige Linse L1 durch einen Achromaten mit 200 mm Brennweite, so verringert sich dadurch der Strahldurchmesser, was in einem größeren Fokalsvolumen resultiert. Der Vorteil gegenüber der Verwendung eines Objektivs mit geringerer NA besteht darin, dass weiterhin durch die hohe NA mehr Fluoreszenzphotonen durch das Objektiv gesammelt werden.

Leider ist dieser Teil des Umbaus fehlgeschlagen. Nach Austausch der Linse L1 lagen Anregungs- und Detektionsvolumen entlang der Strahlrichtung deutlich auseinander. Auch durch Variation sämtlicher Justagemöglichkeiten konnten die beiden Volumina nicht übereinander gelegt werden. Es bleibt nur die Vermutung, dass die Strahlgeometrie innerhalb des Mikroskopkörpers dieses Phänomen verantwortet. Daher habe ich wieder die bisherige Linse L1 eingebaut. Auch mit dieser ist ein leichter Versatz von ca. $1 \mu\text{m}$ zu beobachten, wodurch die Messungen jedoch nicht merklich beeinflusst werden. Die Überlagerung der beiden Foki wird in Kapitel 5.2 eingehend untersucht.

3.2 Erweiterung um alternierende Anregung

Damit am vorhandene Einzelmolekül-FRET-Spektrometer Messungen mit alternierender Anregung möglich sind, muss die Intensität der beiden verwendeten Laserlinien moduliert werden und gleichzeitig die Information über den gerade aktiven Laser in den Datenstrom eingebracht werden.

Der AOM lässt sich durch externe Signale steuern. Für jede gespeicherte Laserlinie kann die Intensität getrennt geregelt werden, indem an den entsprechenden Pin im Signalkabel der AOM-Steuerung eine Spannung zwischen 0 und 10 V angelegt wird. Die Leistung des Schallgebers im AOM erhöht sich linear mit der angelegten Spannung [1]. Zusätzlich existiert ein weiterer Eingang, *Blanking* genannt, bei dem über eine angelegte Spannung alle Laserlinien gemeinsam geregelt werden können. Da bei alternierender Anregung die Laserintensitäten nur individuell gesteuert werden sollen, wird an diesen Eingang durch ein Netzteil eine konstante Spannung von 10 V gelegt.

In den Signalstrom der detektierten Photonen lassen sich zusätzliche externe Marker einbringen. Dazu sind im Signalkabel vom Router zur TimeHarp200-Karte drei Leiterbahnen für unterschiedliche Marker reserviert. Diese lassen sich über eine kleine, selbst angefertigte Einkoppeleinheit ansprechen. Über ein Y-Kabel werden die Markersignale zusammen mit den Daten detektierter Photonen zur weiteren Verarbeitung an die Messkarte geleitet.

Der verwendete Pulsgenerator (Lyons PG 73N, Lyons Instruments) verfügt über zwei Ausgänge, welche zwar denselben Taktgeber benutzen, für die jedoch unabhängig voneinander die Pulslänge und -amplitude eingestellt werden können. Die Signalepulse lassen sich zeitlich verzögert zueinander ausgeben. Dadurch eignet sich dieser Pulsgenerator zur individuellen Steuerung zweier Laserlinien für die alternierende Anregung. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt ist, teilt sich das Signal der beiden Ausgänge auf. Zum einen werden die Pulse in die Steuereinheit des AOM gegeben, um dort die entsprechende Modulation der Laserintensität auszulösen. Gleichzeitig wird das Signal auch über die Einkoppeleinheit in den von den APDs kommenden Datenstrom eingefügt. Dabei wird jeweils bei der ansteigenden Flanke des Pulssignals ein entsprechender Eintrag in der Ausgabedatei erzeugt. Damit man die gewünschte Pulssequenz am Pulsgenerator einstellen kann, wird das Signal zur Einkoppeleinheit zusätzlich in ein Oszilloskop geleitet (dieses ist in Abbildung 3.3 nicht eingezeichnet).

In Abbildung 3.4 ist oben die alternierende Intensität der beiden Anregungslaser und unten der detektierte Datenstrom bei einer ALEX-Messung skizziert. Immer zu Beginn eines Laserpulses wird in den Datenstrom ein entsprechender Marker eingebracht, anhand dessen bei der Auswertung erkannt wird, welcher Laser während der Detektion eines Photons aktiv war.

Die TimeHarp200-Karte erwartet als Markersignal ein digitales TTL-Signal von mindestens 200 ns Länge und einer Spannung von $\geq 2,4$ V. Da vom Pulsgenerator ein analoges Signal erzeugt wird ist darauf zu achten, dass insbesondere die Mindestspannung erreicht wird. Tatsächlich werden die vom Pulsgenerator ausgegebenen 10 V auf alle drei Abnehmer (AOM, Einkoppeleinheit und Oszilloskop) verteilt, so dass es manch-

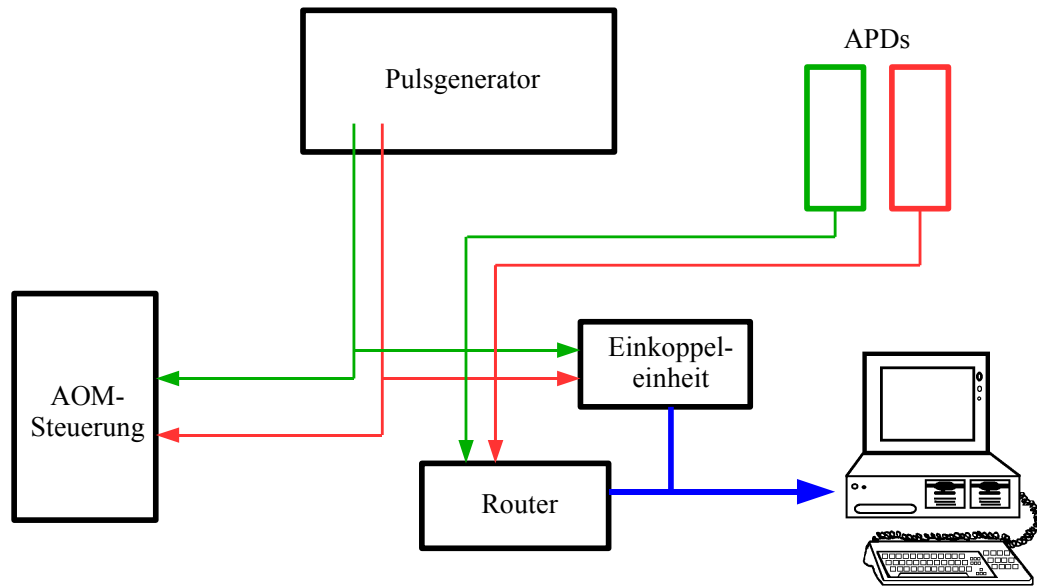


Abbildung 3.3: Übersicht der Steuerung für die alternierende Laseranregung. Das Signal des Pulsgenerators wird sowohl zur Steuerung der Laserintensität genutzt, wie auch als Markersignal, um die jeweils aktive Laserlinie im Datenstrom zu verankern.

mal vorkommt, dass die Spannung zu gering ist und zusätzlich auf die abfallende Flanke des Pulssignals ein Marker gesetzt wird. Dies wird allerdings von der Auswertesoftware (siehe Kapitel 4) erkannt und die zu viel gesetzten Marker werden aus dem Signalstrom entfernt.

Für jedes erfasste Photon werden die folgenden Informationen gespeichert:

1. Der Detektor, in welchem das Photon registriert wurde,
2. die makroskopische Zeit seit Beginn des Experiments
3. und die Ankunftszeit relativ zum SYNC-Signal.

Diese Information wird in einer 32 Bit langen Datenstruktur gespeichert. Für die makroskopische Zeit stehen 16 Bit zur Verfügung, was bei einer Auflösung von 100 ns ungefähr 6,5 ms entspricht. Alle 6,5 ms wird der Zähler auf Null gesetzt und dies durch ein entsprechendes Markersignal (Overflow) im Datenstrom vermerkt. Die Ankunftszeit der Photonen relativ zum SYNC-Signal wird mit einer zeitlichen Auflösung von maximal 39 ps in einem 12 Bit langen Wert gespeichert. Da die TimeHarp200-Karte die Signale von bis zu vier Detektoren verarbeiten kann, ist der Detektor in 2 Bit kodiert. Zusätzlich gibt es ein Bit, welches angibt, ob es sich bei dem registrierten Ereignis um ein Photon handelt oder um ein Steuersignal im Datenstrom, d.h. eine Markierung, dass der Zähler der makroskopischen Zeit auf Null gesetzt wurde, oder ein Marker für den Beginn eines Laserpulses.

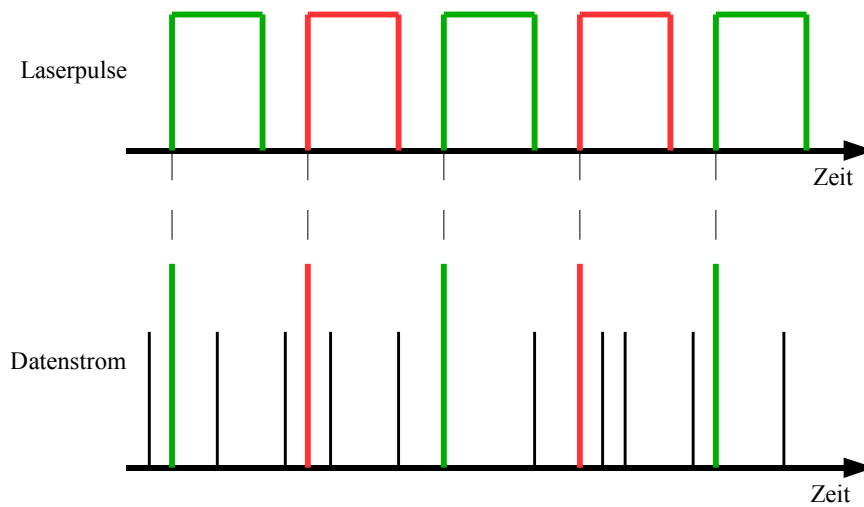


Abbildung 3.4: Skizze der Laserpulse bei alternierender Anregung mit dem entsprechenden Datenstrom. Immer zu Beginn eines Laserpulses wird ein entsprechender Marker eingefügt. Die schwarzen Striche symbolisieren detektierte Photonen.

Für die Aufnahme der Daten, welche in Kapitel 5.3 analysiert werden, wurde die Steuerelektronik leicht abgewandelt. Bei dieser Messung ging es nicht nur darum den Anfang, sondern auch das Ende eines Laserpulses im Datenstrom zu markieren. Zu diesem Zweck wurde nur der Donorlaser alterniert und der Ausgangspuls des Lyons-Pulsgenerators zusätzlich in den Triggereingang eines weiteren Pulsgenerators (HP 8082A) geleitet, welcher auf die abfallende Flanke ein Pulssignal ausgibt. Wird mit dem Signal des zweiten Pulsgenerators nun ein zweiter Marker gesetzt, hat man im Datenstrom sowohl Anfang als auch Ende eines Laserpulses eingetragen. Diese Form des Aufbaus ist in Abbildung 3.5 dargestellt und in Abbildung 3.6 die Form des Lasersignals und des Datenstroms.

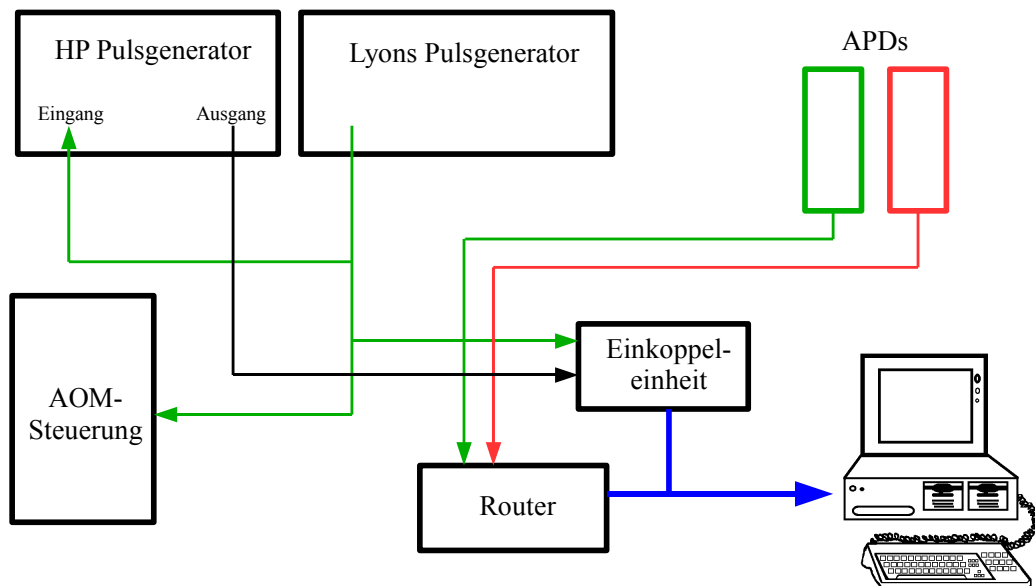


Abbildung 3.5: Übersicht des ALEX-Aufbaus, wie er für die Messung in Kapitel 5.3 verwendet wurde. Das Signal des Lyons-Pulsengenerators wird hierbei zusätzlich in einen zweiten Pulsengenerator geleitet, welcher auf die abfallende Flanke ein Signal ausgibt. Dieses wiederum setzt einen Marker am Ende des Laserpulses.

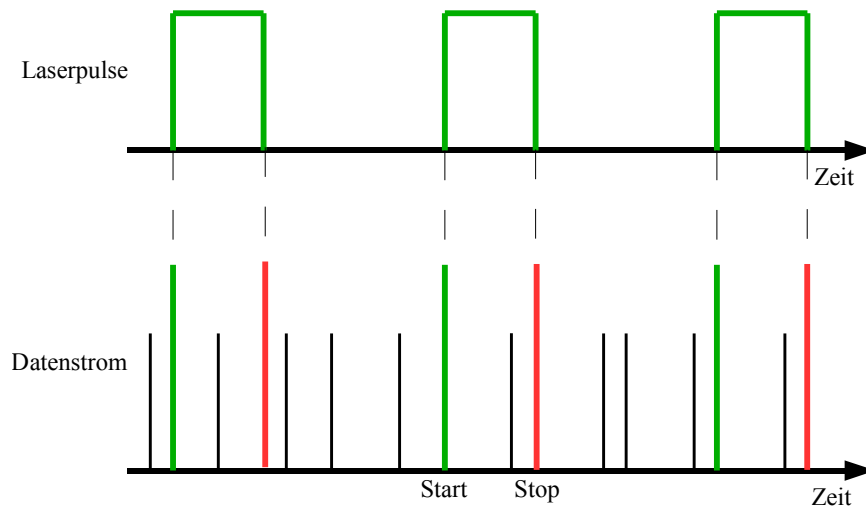


Abbildung 3.6: Skizze der Laserpulse und der Marker im Datenstrom, wenn sowohl Start- als auch Stopmarker gesetzt werden.

4 Das Programm zur Auswertung der ALEX-Daten

Das von mir geschriebene Programm eignet sich dazu, aus ALEX-Messungen Histogrammdata sowohl für zweidimensionale P-S-Diagramme als auch für die Verteilung der Proximity Ratio zu gewinnen. Diese Daten können anschließend mit einer externen Software wie Igor Pro oder Origin dargestellt und weiter analysiert werden. Für die Analyse der P-Verteilung lässt sich ein Bereich des S-Raums auswählen. Dadurch lassen sich einfach markierte Proben aus den Messdaten herausfiltern und das P-Histogramm nur auf Basis doppelt markierter Moleküle, das heißt ohne störenden Einfluss von D_{only} - und A_{only} -Proben, erstellen.

Die von der TimeHarp Software ausgegebenen binären *.t3r-Dateien bestehen aus einem Dateikopf, der Angaben zur Hardware und den Messbedingungen erhält und dem Dateikörper, welcher die Daten zu den aufgezeichneten Photonen und Pulsmarkern enthält. Genauere Angaben zum Dateikopf finden sich in der Dokumentation der TimeHarp200-Messkarte, Angaben zum Datenformat des Dateikörpers in Kapitel 3.2. Diese Daten werden zunächst eingelesen.

Im Programm sind zwei unterschiedliche Routinen zur Erkennung der Bursts implementiert. Die erste arbeitet mit einer festen Anzahl Alternierungsperioden und prüft, in welchen dieser Intervallen eine genügend hohe Zahl an Photonen eingetroffen ist, was dann als ein Burst registriert wird. Die zweite Variante basiert auf einzelnen Alternierungsperioden und findet die Bursts über deren gesamte Länge. Beide Versionen werden im Folgenden beschrieben.

Der grundsätzliche Ablauf der Datenaufbereitung ist für beide Versionen gleich und arbeitet mit den folgenden Schritten:

1. Zunächst werden für jeden Anregungspuls die Daten der einzelnen Photonen gelesen, für jeden Kanal getrennt addiert und zusammen mit dem aktiven Laser und dem Zeitpunkt des Ereignisses in einer Datenstruktur gespeichert.
2. Nun folgt die Bursterkennung, welche für beide Analyseverfahren in den folgenden Abschnitten beschrieben wird.
3. Zuletzt werden die Daten in eine ASCII-Datei geschrieben, welche von externen Programmen gelesen werden kann.

Die zur Auswertung der Daten nötigen Parameter sind in der Datei `alex.ini` festgelegt und können mit einem Editor entsprechend den Messbedingungen angepasst werden.

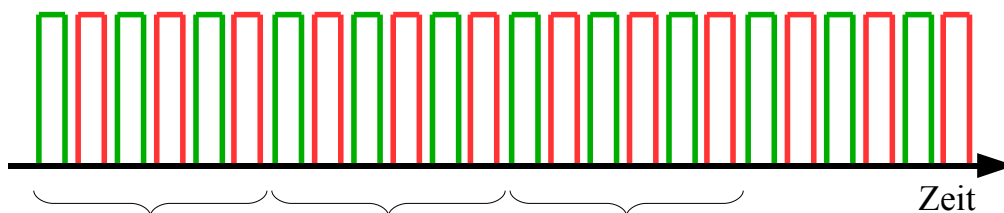


Abbildung 4.1: Bei der Burstanalyse mit fester Anzahl Alternierungsperioden wird eine bestimmte Menge Perioden zusammengefasst und überprüft, ob in dieser Zeit eine Mindestzahl an Photonen detektiert wurde.

Einen ausführlichen Überblick über alle Parameter wird im Anhang A.3 gegeben. Eine Beschreibung aller möglicher Formen der Datenausgaben des Programms ist in Anhang A.2 gegeben.

4.1 Burstanalyse mit fester Anzahl an Alternierungsperioden

Bursts werden bei dieser Analyse in zwei Schritten detektiert. Zunächst werden mehrere Alternierungsperioden zusammengefasst, wie es in Abbildung 4.1 dargestellt ist. Die Anzahl richtet sich nach der Alternierungsperiodenlänge und der Diffusionszeit der Moleküle. Dabei werden Korrekturen für das Übersprechen, direkte Anregung, Hintergrund und das Intensitätsverhältnis der beiden Anregungspulse angebracht. Danach werden die Bursts bestimmt, indem für jede der zusammengefassten Perioden geprüft wird, ob die Photonenzahl bei Donor- oder Akzeptoranregung eine bestimmte Schwelle überschreitet. Ist dies der Fall, wird die Proximity Ratio P und der Stöchiometriefaktor S bestimmt und diese, zusammen mit dem Zeitpunkt des Bursts, in einer Datenstruktur gespeichert.

Um passende Werte für die Anzahl zusammenzufassender Alternierungsperioden zu bekommen, kann man die Verteilung der Burstdauern zu Rate ziehen. Die Mindestzahl Photonen pro Zusammenfassung der Perioden schätzt man anhand der Zählrate der Teilchen und dem Anteil der Bestrahlzeit ab. Um diese Parameter allerdings präzise zu bestimmen muss eine Analyse ähnlich der in Kapitel 5.4.1 durchgeführt werden. Da bei Einzelmolekülbedingungen gemessen wird, ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass innerhalb weniger Mikrosekunden zwei Teilchen in den Fokus gelangen. Deshalb sollten einige folgende zusammengefasste Perioden von der Bursterkennung ausgeschlossen werden.

In Abbildung 4.2 ist die Vorgehensweise dieser Burstanalyse skizziert. Werden innerhalb einer bestimmten Anzahl zusammengefasster Anregungsperioden genügend Photonen detektiert, so wird dies als Burst registriert. Da kein Augenmerk darauf gerichtet

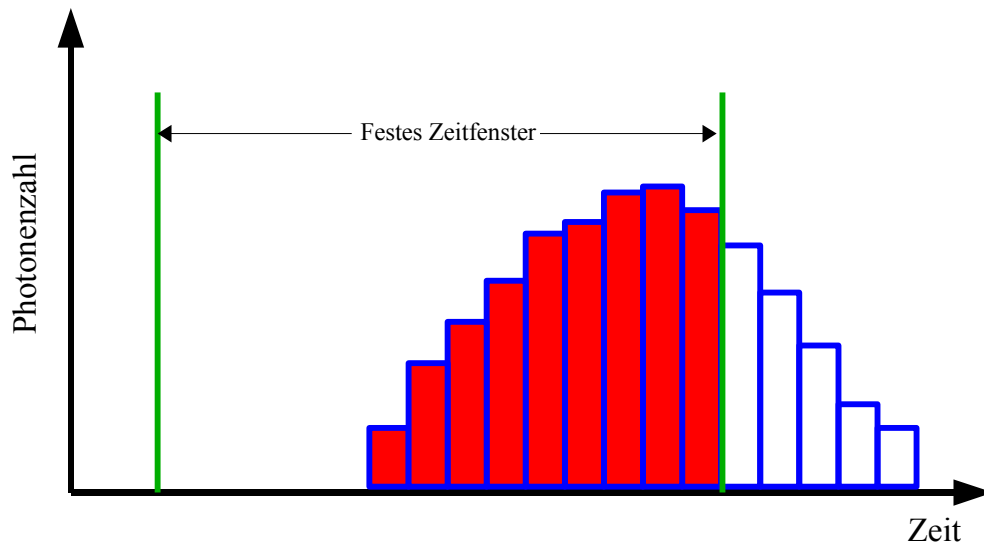


Abbildung 4.2: Grafische Darstellung der Burstdetektion mit festen Zeitintervallen. Sobald die Photonenzahl in einem Intervall hoch genug ist, wird dieses als Burst registriert. Allerdings kommt es vor, dass durch das starre Zeitfenster Photonen des Bursts nicht in die Auswertung einfließen, was zu einer schlechteren Photonenzahlstatistik führt.

wird, wann der Burst aufhört, kommt es häufig vor, dass ein Teil der Photonen nicht registriert wird. Dies schlägt sich in einer schlechteren Photonenzahlstatistik nieder, wie es sich in Kapitel 4.3 beim Vergleich dieser mit der im Folgenden erläuterten Analyse- methode zeigt.

4.2 Burstanalyse auf Basis der ganzen Burstlänge

Bei der Burstanalyse auf Basis der gesamten Länge der Bursts wird auf die Zusammenfassung der Alternierungsperioden verzichtet und statt dessen der Burst als Ganzes betrachtet. Es wird dabei jede Alternierungsperiode einzeln betrachtet. Liegt die Photonenzahl einer Periode über einer gewissen Schwelle, wird diese Periode als Start eines Bursts markiert. Liegen die folgenden Perioden ebenfalls oberhalb dieser Schwelle, zählen auch diese zum Burst (Abbildung 4.3). Beinhaltet eine Alternierungsperiode zu wenige Photonen, wird zunächst überprüft, ob diese zusammen mit den folgenden beiden Perioden im Durchschnitt über der Schwelle liegen. Ist das der Fall, zählt auch diese Periode zum Burst, obwohl ihre Intensität zu gering ist. Liegt der Durchschnitt darunter, wird die Periode, welche als letzte über der Schwelle lag, als Burstende markiert. Dieses Verfahren stellt sicher, dass das Burstende nicht zu früh gesetzt wird, falls die Photonenzahl einer Alternierungsperiode auf Grund statistischer Schwankung unterhalb der gesetzten Schwelle liegt.

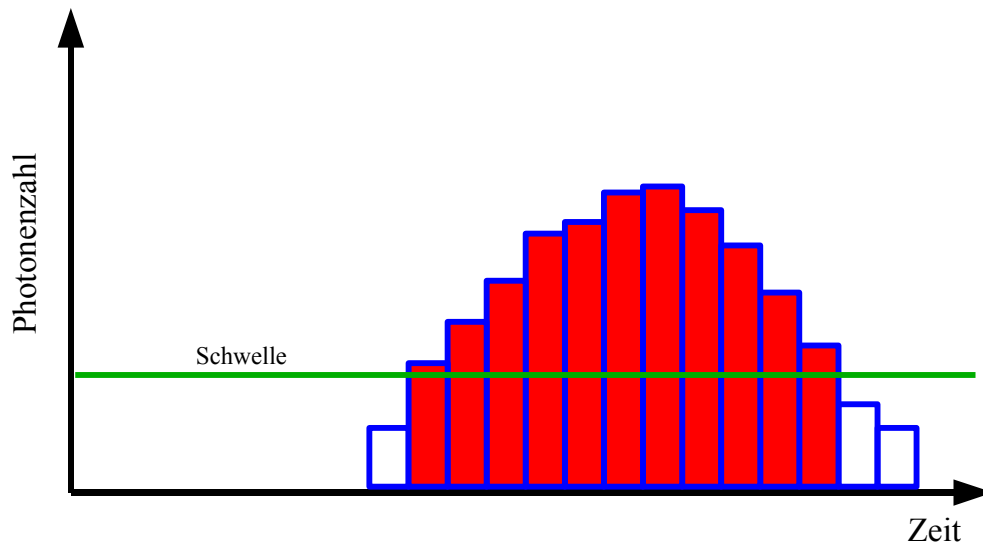


Abbildung 4.3: Grafische Darstellung der Arbeitsweise der Burstanalyse auf Basis der gesamten Burstlänge. Sobald die Photonenzahl einer Alternierungsperiode über einer gewissen Schwelle liegt, wird diese zum Burst gezählt, ebenso alle folgenden, die oberhalb der Schwelle sind.

Für jeden erkannten Burst werden nun die Korrekturen für das Übersprechen, die direkte Anregung, das Hintergrundrauschen und das Intensitätsverhältnis der Donor- und Akzeptoranregung durchgeführt und aus der Gesamtzahl aller Photonen zwischen der ersten und der letzten zugehörigen Periode die Proximity Ratio P und der Stöchiometriefaktor S berechnet. Auf Grund der Tatsache, dass bei diesem Verfahren wirklich alle Photonen eines Bursts berücksichtigt werden, erhält man eine deutlich bessere Photonenzahlstatistik als bei der Analyse mit fester Zeitachseinteilung (siehe Kapitel 4.3). Für die biologische Forschung sollte daher diesem Verfahren zur Burstanalyse der Vorzug gegeben werden.

Auswahlkriterien für diese Burstanalyse sind die Burstlänge und die Photonenzahlrate innerhalb der Bursts. Passende Begrenzungen hierfür lassen sich an den entsprechenden Histogrammen grob abschätzen. In Kapitel 5.4.1 wird anhand eines Beispiels eine ausführliche Analyse des Einflusses dieser Parameter durchgeführt, welche zu wesentlich präziseren Ergebnissen kommt.

4.3 Vergleich beider Auswerteroutinen

In diesem Kapitel soll untersucht werden, inwieweit sich die beiden Analyseverfahren in Bezug auf die Photonenzahlstatistik unterscheiden. Dazu wurde dieselbe Nukleosomenprobe ausgewertet, für die in Kapitel 5.4 die Analyse der optimalen Burstparameter durchgeführt wurde; somit waren die Randbedingungen bekannt. Die Anregungssequenz war

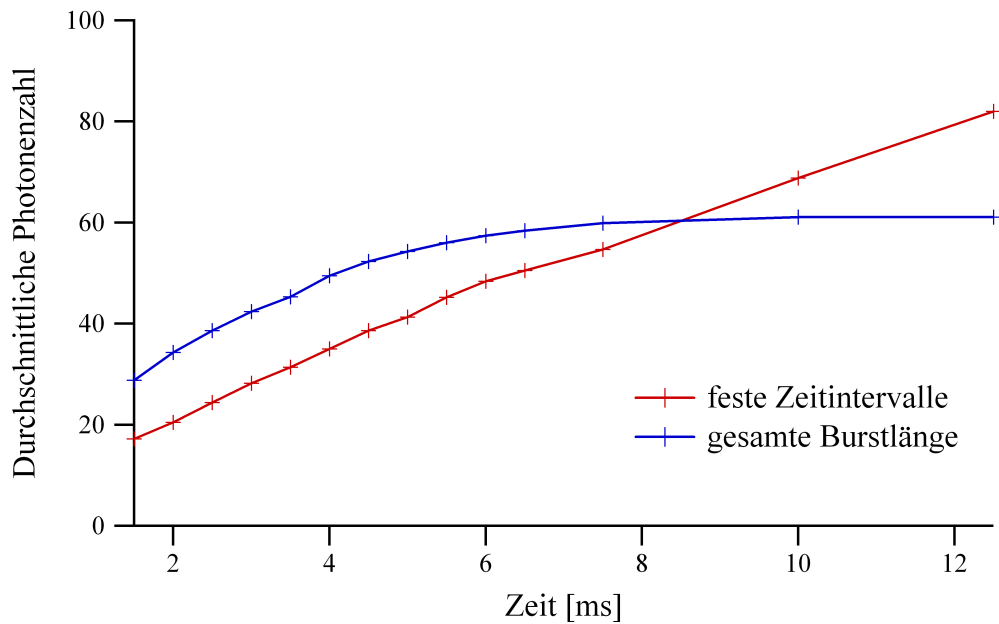


Abbildung 4.4: Die mittlere Photonenzahl in Abhängigkeit der erlaubten Burstlänge für das Analyseverfahren mit fester Anregungsperiodenzahl (rot) und die Burstanalyse über die gesamte Burstlänge (blau).

100–25–100–25, bei der der Skalierungsfaktor 1,3 betrug. Dadurch wurden die Photonenzahlen durch diesen Korrekturfaktor möglichst wenig beeinflusst. Die Schwelle der Photonenzahl pro Alternierungsperiode wurde wie in Kapitel 5.4 auf zwei Photonen festgelegt; bei der Analyse mit einer festen Anzahl an Alternierungsperioden (Analysemethode 1) wurde die Mindestzahl an Photonen entsprechend der Zahl der zusammengefassten Perioden angepasst. Bei der Analyse auf Basis der gesamten Burstlänge (Analysemethode 2) wurde die untere Grenze der Burstlänge auf 1 ms (das entspricht vier Alternierungsperioden) gesetzt, die erlaubten Photonenzahlen lagen zwischen 25 und 80 kHz (vergleiche hierzu auch Kapitel 5.4).

Für unterschiedliche erlaubte Burstlängen wurde die durchschnittliche Photonenzahl pro Burst ermittelt. Für die Analysemethode 1 bedeutet dies, dass entsprechend viele Perioden zusammengefasst werden. Bei der Analysemethode 2 lag die Länge der Bursts zwischen 1 ms und der variierten Obergrenze. In Tabelle 4.1 sind die jeweils ermittelten durchschnittlichen Photonenzahlen zusammen mit der Burstzahl im Bereich des S-Raums zwischen 0,3 und 0,8 für beide Analysemethoden aufgeführt; in Abbildung 4.4 ist diese in Abhängigkeit der soeben erläuterten Obergrenze für beide Burstanalysemethoden aufgetragen. Man erkennt, dass bis zu einer erlaubten Burstlänge von 8 ms die mittlere Photonenzahl pro Burst bei der Analysemethode 2 höher ist als bei Methode 1. Die Ursache hierfür liegt darin, dass bei der Analysemethode 1, wie in Abbildung 4.2 angedeutet, einige Photonen, die vom selben Teilchen stammen, durch das starre Zeitfenster nicht berücksichtigt werden.

Für Burstlängen jenseits von 8 ms bleibt die Photonenzahl bei Analysemethode 2 konstant (in Tabelle 4.1 sieht man, dass auch die Burstzahl nicht mehr zunimmt), während sie bei Analysemethode 1 linear ansteigt. Dies liegt daran, dass bei Methode 1 mit zunehmender Anzahl zusammengefasster Alternierungsperioden immer häufiger zwei Teilchen nacheinander durch den Fokus diffundieren, jedoch als ein Burst mit entsprechend mehr Photonen registriert werden. Bei Analysemethode 2 hingegen wird geprüft, wie lange die Photonenzahl oberhalb der Schwelle liegt; zwei Teilchen, die nacheinander durch das Detektionsvolumen diffundieren, werden somit als zwei getrennte Ereignisse wahrgenommen.

In Kapitel 5.4 wird gezeigt, dass eine sinnvolle Obergrenze der Burstlänge bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben bei 5 ms liegt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher ausschließlich die Burstanalyse über die gesamte Länge des Bursts benutzt, da diese bei vergleichbaren Rahmenbedingungen deutlich mehr Photonen pro Burst liefert.

| Burstlänge [ms] | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 | 3,5 | 4,0 | 4,5 | 5,0 | 5,5 | 6,0 | 6,5 | 7,5 | 10,0 | 12,5 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Analysemethode 1: | | | | | | | | | | | | | | |
| mittlere Photonenzahl | 17,2 | 20,5 | 24,4 | 28,2 | 31,4 | 35,0 | 38,6 | 41,3 | 45,2 | 48,4 | 50,5 | 54,7 | 68,8 | 82,0 |
| Burstzahl | 1658 | 1644 | 1596 | 1564 | 1474 | 1363 | 1345 | 1295 | 1200 | 1162 | 1140 | 1034 | 848 | 705 |
| Analysemethode 2: | | | | | | | | | | | | | | |
| mittlere Photonenzahl | 28,8 | 34,3 | 38,6 | 42,4 | 45,3 | 49,5 | 52,3 | 54,3 | 56,0 | 57,4 | 58,4 | 59,9 | 61,1 | 61,1 |
| Burstzahl | 180 | 365 | 525 | 642 | 721 | 802 | 855 | 883 | 910 | 925 | 936 | 951 | 963 | 963 |

Tabelle 4.1: Für beide Analyseverfahren ist für verschiedene erlaute Burstlängen die mittlere Photonenzahl und die Burstzahl gezeigt. Analysemethode 1 ist dabei diejenige mit festen Zeitintervallen, Analysemethode 2 diejenige, die Bursts über deren gesamten Länge erfasst.

5 Charakterisierung des ALEX-Systems

Das Einzelmolekül-FRET-Spektrometer mit der Erweiterung um alternierende Laseranregung wurde charakterisiert. Zunächst wird gezeigt, dass sich die in Kapitel 2.3 theoretisch erörterten Eigenschaften der alternierenden Anregung experimentell bestätigen. Die Überlappung der Foki beider Anregungslaser wurde untersucht, ebenso das Antwortverhalten des AOM. Schließlich wurde der Einfluss der Anregungssequenz und der Parameter der Burstselektion auf die Messergebnisse charakterisiert.

5.1 Vorteile der alternierenden Laseranregung gegenüber herkömmlichen Einzelmolekül-FRET-Messungen

In diesem Kapitel wird zunächst gezeigt, dass die experimentellen P-S-Diagramme ausgewählter Proben der theoretischen Vorhersage entsprechen (vergleiche hierzu Abbildung 2.8). Außerdem wird dargelegt, in welchen Fällen die alternierende Laseranregung Vorteile gegenüber herkömmlichen Einzelmolekül-FRET-Messungen hat. Schließlich wird demonstriert, dass die mittlere Proximity Ratio von FRET-aktiven Proben bei beiden Messverfahren dieselbe ist.

In Abbildung 5.1 sind für folgende Proben die P-S-Diagramme gezeigt: a) Eine nur mit dem Donor versehene D_{only} -Probe, b) eine nur mit dem Akzeptor markierte A_{only} -Probe, c) eine doppelt markierte Probe, bei der die Farbstoffe allerdings so weit auseinander sind, dass es keinen Energietransfer gibt (NoFRET-Probe) und d) eine Nukleosomenprobe, welche FRET-aktiv ist. Detektierte Bursts der D_{only} -Probe befinden sich wie erwartet bei hohem Stöchiometriefaktor S und einer Proximity Ratio um Null. Die A_{only} -Probe liegt im P-S-Diagramm entgegengesetzt, bei hohen P-Werten und einem geringen Stöchiometriewert. Bei der NoFRET-Probe zeigt sich, dass sie neben doppelt markierten Spezies, die im mittleren S -Raum liegen, auch Anteile von A_{only} und D_{only} aufweist, also ein Gemisch unterschiedlicher Spezies ist. Mit alternierender Anregung konnte also gezeigt werden, dass diese Probe keinen optimalen Markierungsgrad aufweist und einige Moleküle nur einen der beiden Farbstoffe tragen. Es fällt auf, dass sich die P-Werte des doppelt markierten Anteils im unteren S -Raum zu höheren Werten hin verschieben. Diese Verschiebung spiegelt die direkte Anregung des Akzeptors durch den Donorlaser wieder. Fällt die direkte Anregung einzelner Teilchen stärker aus

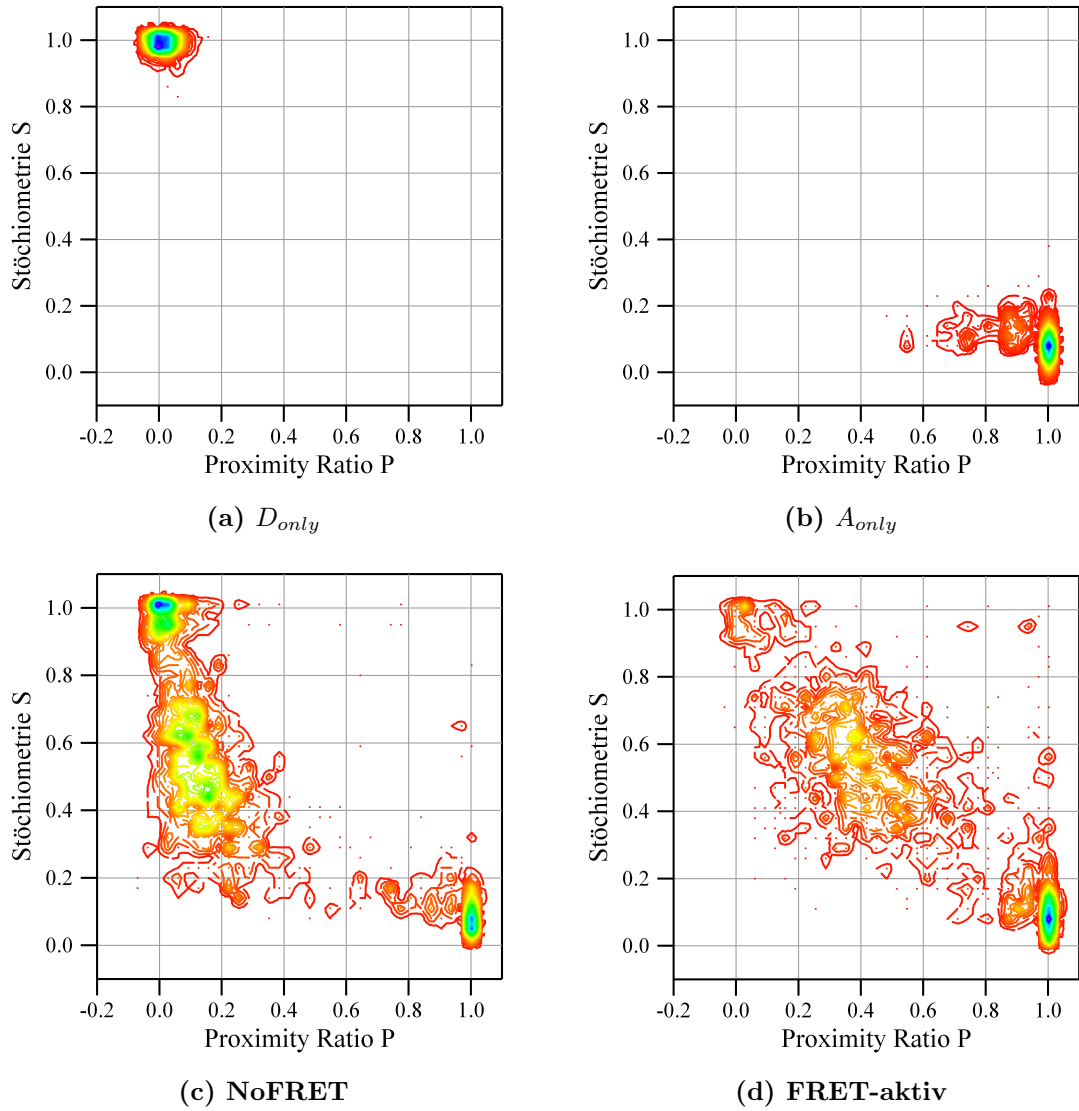


Abbildung 5.1: P-S-Diagramme (a) einer D_{only} -, (b) einer A_{only} -, (c) einer NoFRET- und (d) einer FRET-aktiven Probe.

als die Korrektur, so haben diese positive P-Werte, gleichzeitig liegen sie im S-Raum niedriger auf Grund der höheren Intensität im Akzeptorkanal. Schließlich ist das P-S-Diagramm der FRET-aktiven Probe präsentiert, welche eine deutliche Häufung um $S = 1/2$ und mittleren Werten der Proximity Ratio P hat; sie weist ebenfalls Anteile von D_{only} und A_{only} auf.

Mit ALEX ist es möglich zu erkennen, ob die Verteilung der Proximity Ratio P nur von einer NoFRET-Probe stammt oder ob es sich um eine Überlagerung von NoFRET- mit D_{only} -Ereignissen handelt. In Abbildung 5.2 ist oben für die in Abbildung 5.1 gezeigte NoFRET-Probe das P-S-Diagramm mit dem selektierten Bereich des S-Raums und die daraus gebildete Verteilung der Proximity Ratio präsentiert. Links unten ist ein P-S-Diagramm gezeigt, in dem zur Veranschaulichung der mit einer herkömmlichen FRET-Messung betrachtete Bereich – nämlich alle Teilchen, die einen Donorfarbstoff tragen – markiert ist. Daneben ist die mit einer herkömmlichen Einzelmolekül-FRET-Messung gewonnene Verteilung der Proximity Ratio gezeigt. Auf Grund der unterschiedlichen Auswertesoftware der beiden Verfahren haben die P-Histogramme eine unterschiedliche Dimension, was die Grundaussagen aber nicht beeinflusst. In beiden Verteilungen erkennt man die durch die direkte Anregung des Akzeptors verursachte Verbreiterung der Verteilung zu höheren FRET-Werten hin. Die Verteilung der ALEX-Messung wird durch eine Gausskurve beschrieben. Diejenige der klassischen FRET-Messung lässt sich jedoch nur als eine Überlagerung zweier Gausskurven darstellen, jeweils eine für den D_{only} - und den NoFRET-Anteil. Diese Subpopulationen sind im Verteilungsdiagramm (Abbildung 5.2 rechts unten) durch zwei getrennte Gausskurven dargestellt; in schwarz ist die Summe beider Verteilungen eingezeichnet. Durch die Nähe der Maxima lassen sich die Trennung in beide Spezies allerdings mit einem großen Fehler behaftet; über die genaue Verteilung der No-FRET-Messung lässt sich bei Anregung mit nur einer Wellenlänge lediglich eine ungenaue Aussage treffen. Da bei der ALEX-Messung für die Erzeugung des P-Histogramms der entsprechende Bereich des S-Raums selektiert werden kann, bekommt man eine Verteilung ohne den Einfluss der D_{only} -Teilchen. In [15] stellt A. Gansen ein alternatives Verfahren vor, bei dem der Detektionsfaktor γ bewusst verändert wird und so die Empfindlichkeit im Bereich niedriger Proximity Ratio erhöht wird (siehe dazu auch Kapitel 2.2.2). Dadurch lassen sich zwei Proben mit niedrigem Energietransfer zwar etwas besser auftrennen, jedoch ist dies nicht in dem Maße möglich wie mit alternierender Laseranregung.

Es bleibt zu klären, ob eine Messung mit alternierender Laseranregung dieselbe Verteilung der Proximity Ratio ergibt wie eine herkömmliche Einzelmolekül-FRET-Analyse. Dazu sind in Abbildung 5.3 die P-Histogramme der FRET-aktiven Probe in Abbildung 5.1 gegenübergestellt. Das P-Histogramm der klassischen Messung weist bei $P = 0$ eine weitere Population auf, welche bei der ALEX-Messung nicht auftritt. Diese Spitze zeigt den geringen Anteil an D_{only} -Teilchen, welche auch im P-S-Diagramm (Abbildung 5.1) zu sehen ist. Bei der Erstellung der P-Verteilung bei der ALEX-Messung konnte diese Spezies durch Einschränkung des S-Raums auf den Bereich zwischen 0,3 und 0,8 entfernt werden. Das Maximum der Verteilung variiert nur leicht: Bei der ALEX-Messung liegt es bei $0,394 \pm 0,007$, die klassische Messung liefert $0,354 \pm 0,008$.

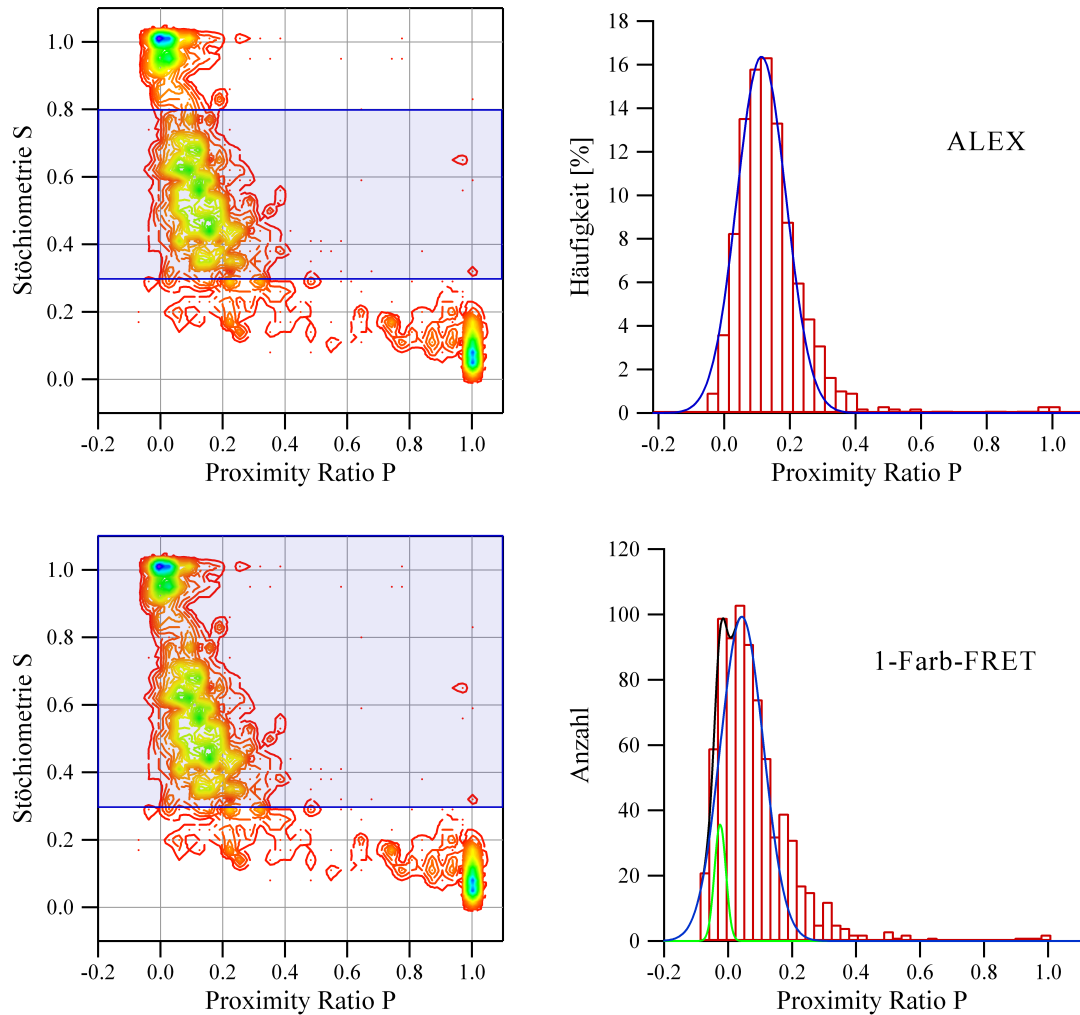


Abbildung 5.2: Für die in Abbildung 5.1 (c) präsentierte NoFRET-Probe ist oben das P-S-Diagramm mit betrachtetem S-Raum und das aus diesem Bereich mit ALEX gebildete P-Histogramm gezeigt. Darunter ist im P-S-Diagramm der Bereich gekennzeichnet, der mit klassischen FRET-Messungen ausgewertet wird. Die Verteilung der Proximity Ratio P setzt sich bei klassischer Einzelmolekül-FRET-Messung aus zwei Komponenten zusammen, eine des D_{only} -Anteils und eine des NoFRET-Anteils.

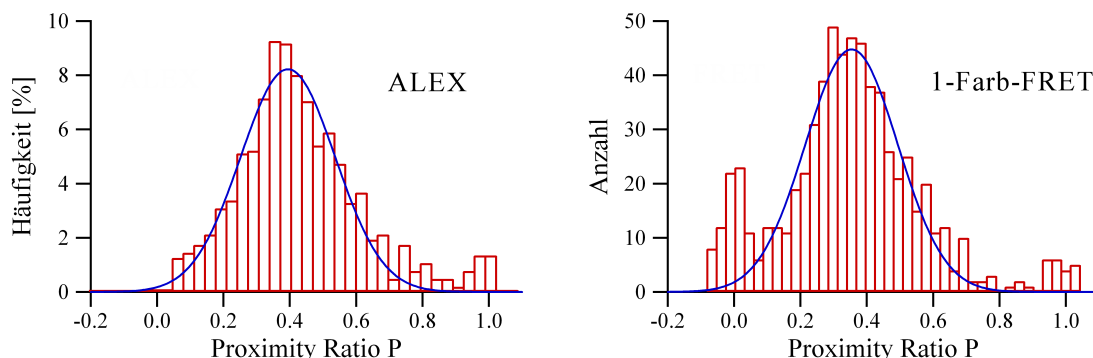


Abbildung 5.3: Vergleich der Verteilung der Proximity Ratio einer FRET-aktiven Probe bei Messung mit alternierender Laseranregung mit jener einer herkömmlichen Einzelmolekül-FRET-Messung. Das Maximum der Verteilung variiert nur unwesentlich (ALEX-Messung: Maximum bei $0,394 \pm 0,007$, Halbwertsbreite von $0,202 \pm 0,011$; klassische FRET-Messung: Maximum bei $0,354 \pm 0,008$, Halbwertsbreite von $0,198 \pm 0,013$).

Dieser kleine Unterschied ist nicht signifikant und kann an der unterschiedlichen Weise der Signalkorrekturen der beiden Programme liegen.

Durch Messungen mit ALEX erhält man dieselben Ergebnisse wie bei Anregung mit nur dem Donorlaser. Der große Vorteil dieser Methode zeigt sich vor allem bei der Trennung von D_{only} - und NoFRET-Spezies. Diese lassen sich durch Wahl eines Bereichs des S-Raums sauber voneinander trennen. In diesem Kapitel wurde auch gezeigt, dass ALEX die in Kapitel 2.3 aufgeführten Probleme 1–3 von herkömmlichen FRET-Messungen löst, da man durch die alternierende Anregung A_{only} -Teilchen direkt detektieren kann und zwischen einfach und doppelt markierten Spezies unterschieden werden kann. Das vierte Problem, die Auftrennung anderer Stöchiometrien von Donor und Akzeptor als 1:1, wird in dieser Arbeit nicht behandelt.

5.2 Überlappung der beiden Laserfoki

Für Zweifarbbexperimente mit alternierender Laseranregung ist es nötig, dass die Fokusbereiche der beiden Anregungswellenlängen 488 und 568 nm ausreichend überlappen. Dies wurde mittels einer Kreuzkorrelationsmessung bestätigt. Auf die Theorie soll hier nicht weiter eingegangen werden, diese findet sich in [48] und [44]. Als Probe diente ein NoFRET-Standard. In Abbildung 5.4 sind die Autokorrelationsfunktionen (AKF) dieser Probe bei Donor- und Akzeptoranregung dargestellt; in Tabelle 5.1 sind die Amplituden der Korrelationsfunktionen aufgeführt, die durch Anpassen einer Korrelationsfunktion für dreidimensionale Diffusion an die Messdaten gewonnenen wurden. Wie zu erwarten ist die AKF bei Akzeptoranregung niedriger als die bei Donoranregung. Denn nach Gleichung 3.1 nimmt der laterale Radius des Laserfokus mit der

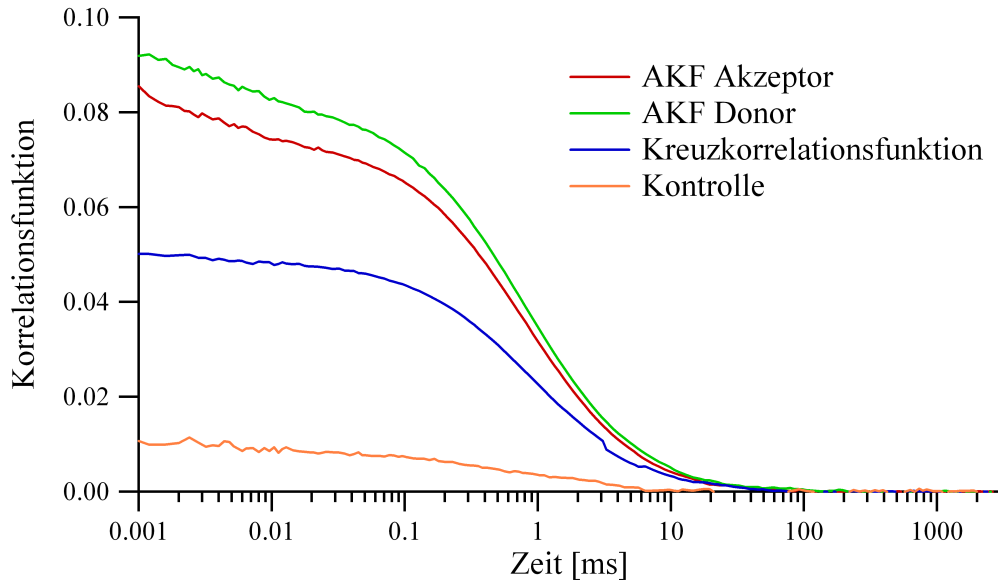


Abbildung 5.4: Die Autokorrelationsfunktionen (AKF) für Anregung durch den Donor- bzw. Akzeptorlaser, sowie die Kreuzkorrelationsfunktion einer NoFRET-Probe. Zudem ist als Gegenprobe die Kreuzkorrelationsfunktion eines Gemisches aus A_{only} - und D_{only} -Teilchen gezeigt.

Wellenlänge zu; es befanden sich also mehr Teilchen im Fokus des 568 nm-Lasers.

Ebenfalls in Abbildung 5.4 ist die Kreuzkorrelationsfunktion (KKF) der NoFRET-Probe in rot gezeigt. Diese ist niedriger als die beiden Autokorrelationsfunktionen, was für einen nicht optimalen Überlapp der beiden Foki spricht. Sie ist jedoch deutlich höher als die KKF einer Kontrollmessung eines Gemischs aus A_{only} - und D_{only} -Teilchen. Dass die KKF der Kontrollmessung keine Amplitude von null hat, liegt am Übersprechen von Photonen der A_{only} -Teilchen in den Donordetektionskanal, was zu einem leicht korrelierten Signal führt.

Die Amplitude der KKF der NoFRET-Probe erreicht 53% des Wertes der AKF des Donorlasers, was im Vergleich mit dem von N. Baudendistel ermittelten Wert [5] einem für Zweifarbbexperimente ausreichenden Überlapp entspricht.

| | Amplitude |
|---|-----------|
| Autokorrelationsfunktion bei Akzeptoranregung | 0,085 |
| Autokorrelationsfunktion bei Donoranregung | 0,093 |
| Kreuzkorrelationsfunktion | 0,049 |

Tabelle 5.1: Die Amplituden der Autokorrelationsfunktion bei Donor- bzw. Akzeptoranregung sowie die Kreuzkorrelationsfunktion.

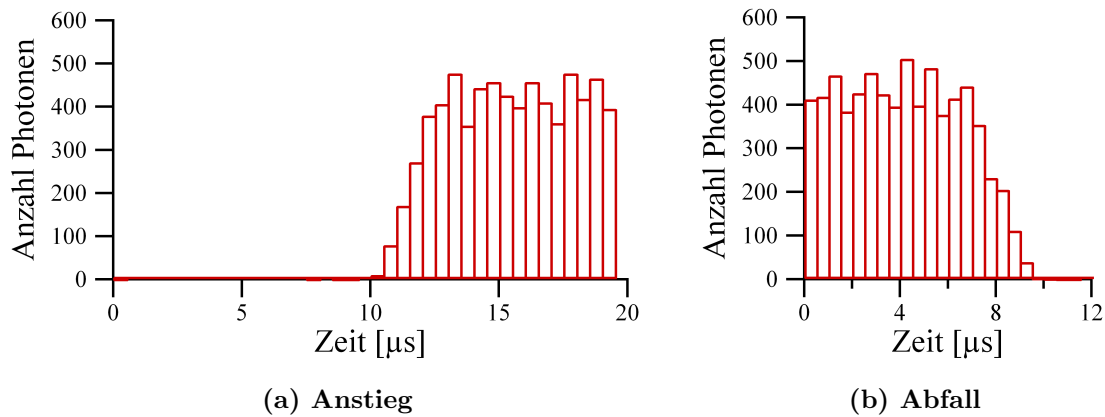


Abbildung 5.5: (a) Anstiegsverhalten des AOM. Etwa $12\ \mu\text{s}$ nach Start des Pulses ist die volle Transmission erreicht, wobei die Anstiegszeit $2\ \mu\text{s}$ beträgt. (b) Bis etwa $7\ \mu\text{s}$ nach Ende des Pulses herrscht derselbe Photonenfluss wie während der Transmissionsphase des AOM. Es schließt sich ein etwa $2\ \mu\text{s}$ dauernder Abfall an.

5.3 Antwortzeit des AOM

Bekommt der AOM vom Pulsgenerator das Signal, den Laser zu aktivieren, dauert es noch einige Mikrosekunden, bis der Photonenstrom einsetzt. Ein entsprechendes Phänomen gibt es nach Beendigung des Pulses, wo ebenfalls für einige Mikrosekunden noch Photonen eintreffen. Aus diesem Grund sollte zwischen zwei Laserpulsen immer eine Phase ohne Laserbestrahlung eingefügt werden. Um zu erfahren, wie groß diese Pause zwischen dem Ende des einen und dem Anfang des folgenden Pulses mindestens sein muss, ist eine quantitative Untersuchung wichtig.

Der Versuchsaufbau für diese Analyse ist am Ende des Kapitels 3.2 erläutert. Das Signal des Pulsgenerators wird in diesem Fall für drei Zwecke genutzt: Wie beim normalen ALEX-Aufbau wird das Signal an den AOM gegeben, um die Alternierung auszulösen, und gleichzeitig an die Messelektronik geleitet. Diese bringt auf die ansteigende Flanke des Pulses ein Markersignal in den Photonenstrom ein. Zusätzlich wird bei diesem Aufbau das Signal an einen zweiten Pulsgenerator gegeben, der auf die abfallende Flanke des Pulses reagiert. Mit diesem Signal wird von der Messkarte ein weiterer Marker in den Datenstrom eingefügt, welcher das Ende des Laserpulses markiert.

Für den 488 nm-Laser wurde das Anstiegs- und Abklingverhalten des AOM untersucht. Eine 200 nM Alexa488-Lösung wurde für kurze Zeit (1 s, damit die Detektoren keinen Schaden nehmen) mit einem alternierenden Laserstrahl beleuchtet und das Signal aufgenommen. Mittels eines kleinen selbstgeschriebenen Programms wurde ein Histogramm der Ankunftszeit der Photonen nach einem Markersignal erstellt. In der linken Darstellung der Abbildung 5.5 ist der Anstieg der Intensität in Bezug auf den Startmarker des Pulsgenerators gezeigt. Bis $10\ \mu\text{s}$ nach dem Startmarker werden keine Photonen detektiert, dann steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon detektiert

wird, bis nach etwa $12\ \mu\text{s}$ nach Beginn des Pulses die Transmission des AOM auf ihrem Maximum ist. Ebenso vergehen etwa $7\ \mu\text{s}$ nach dem Ende des Aktivierungspulses, bis die Transmission innerhalb von ca. $2\ \mu\text{s}$ auf Null zurück geht, wie man in Abbildung 5.5 (b) erkennt.

Da die Schallgeschwindigkeit innerhalb des TeO_2 -Kristalls des AOM endlich ist, benötigt die Schallwelle eine bestimmte Zeit, um vom Schallgeber zum Ort des Laserstrahls zu gelangen. Die Schallgeschwindigkeit v_s beträgt im Kristall $675\ \text{m/s}$ [1], mit dem Abstand b des Schallgebers vom Laserstrahl ergibt sich eine Zeitverzögerung von $t = b/v_s$. Zudem ist die Anstiegs- und Abfallszeit proportional zum Durchmesser des Laserstrahls. Die gemessenen $2\ \mu\text{s}$ entsprechen demnach einem Strahldurchmesser von $1,35\ \text{mm}$, was ein realistischer Wert ist.

Um die Datenaufnahme der beiden Anregungsperioden sauber trennen zu können, sollte also zwischen den beiden Laserpulsen eine Pause von mindestens $15\ \mu\text{s}$ in das Pulsschema eingeplant werden, damit das Messergebnis nicht beeinträchtigt wird.

Mit dieser Analyse kann auch die Frage beantwortet werden, ob nach dem Setzen eines Markers eine gewisse Totzeit der Elektronik einen Verlust von Photonen verursacht. Wie man in Abbildung 5.5 (b) erkennt, ist die Photonenzahl direkt nach dem Stopmarker nicht niedriger als zu anderen Zeitpunkten. Es kommt also zu keinem spürbaren Verlust an Photonen durch das Setzen eines Markers.

5.4 Einfluss wichtiger Mess- und Analyseparameter

Bei Messungen mit alternierender Anregung gibt es einige Parameter, welche die Ergebnisse beeinflussen: Zum einen die Anregungssequenz und zum anderen die Auswahlkriterien für die Bursts. Beispielhaft wird die Diskussion anhand einer doppelt intern markierten Nukleosomenprobe geführt. Ziel der Optimierung ist eine möglichst gute Statistik zur Bestimmung der Proximity Ratio. Während der Anregungsphase durch den Donorlaser sollte also eine möglichst hohe Zahl an Photonen detektiert werden, gleichzeitig sollten möglichst viele Bursts in die Auswertung einfließen. Ereignisse, bei denen sich mehrere Teilchen zur selben Zeit im Detektionsvolumen aufhielten, sollen dabei verworfen werden.

5.4.1 Burstdauer und Anzahl Photonen pro Burst

Zuerst wird der Einfluss unterschiedlicher Auswahlkriterien für die Bursts auf die Anzahl und die Photonenstatistik der Bursts für die Anregungspulssequenz 200–25–50–25 untersucht. Über die Parameter *min_burst_time* und *max_burst_time* wird die erlaubte Länge der Fluoreszenzbursts begrenzt, über die Werte der Parameter *min_burstrate* und *max_burstrate* die erlaubte durchschnittliche Photonenrate innerhalb der Bursts. Eine detaillierte Beschreibung der Parameter zur Burstselektion findet sich in Anhang A.3.

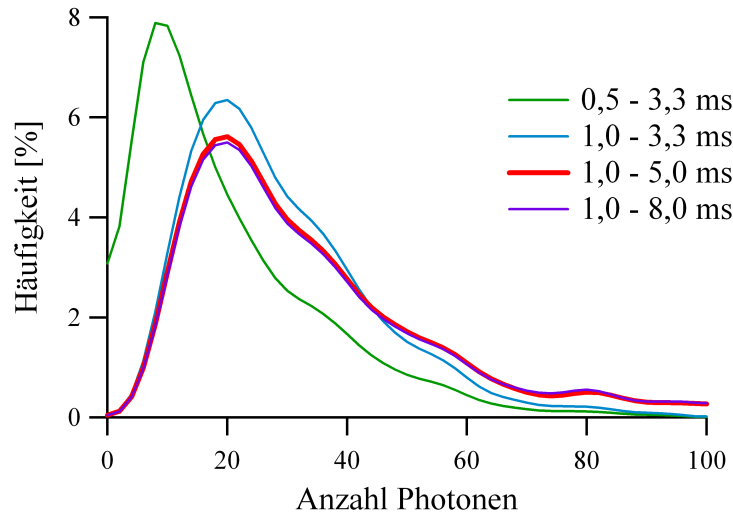


Abbildung 5.6: Die Verteilung der Photonen pro Burst in Abhängigkeit von der erlaubten Dauer der Bursts.

Einfluss der Burstlänge

Für vier unterschiedliche Grenzkombinationen der Parameter *min_burst_time* und *max_burst_time* wurden die Gesamtzahl der Bursts, die Ereignisse im FRET-Bereich $0,3 < S \leq 0,8$ sowie die Anzahl der Photonen während der Donorlaseranregung bestimmt. Die erlaubte Photonenrate war dabei auf den Bereich zwischen 20 und 45 kHz begrenzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Für eine niedrige untere Grenze ist die Gesamtzahl an Ereignissen sehr hoch, vor allem auch im Vergleich zur Ereigniszahl im FRET-Bereich. Wird die untere Grenze zu niedrig gewählt, treten im Verhältnis deutlich mehr A_{only} -Ereignisse ein. Wird die untere Grenze bei 1 ms belassen und die obere Grenze variiert, so verändert sich die Burstzahl oberhalb von 5 ms kaum mehr.

Zur Bestimmung der Proximity Ratio der einzelnen Bursts ist es wünschenswert, die Berechnung auf Basis möglichst vieler Photonen während der Donoranregungsphase durchzuführen. In Tabelle 5.2 ist die jeweilige durchschnittliche Photonenzahl gegeben,

| Bereich der Burstlänge | Bursts gesamt | Anteil an Bursts im FRET-Bereich | durchschnittliche Photonenzahl |
|------------------------|---------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 0,5 - 3,3 ms | 5429 | 35% | 20,93 |
| 1,0 - 3,3 ms | 1825 | 61% | 29,83 |
| 1,0 - 5,0 ms | 2021 | 62% | 35,34 |
| 1,0 - 8,0 ms | 2060 | 62% | 37,14 |

Tabelle 5.2: Die Anzahl an Ereignissen und die durchschnittliche Photonenzahl bei unterschiedlichen Begrenzungen der Burstlängen.

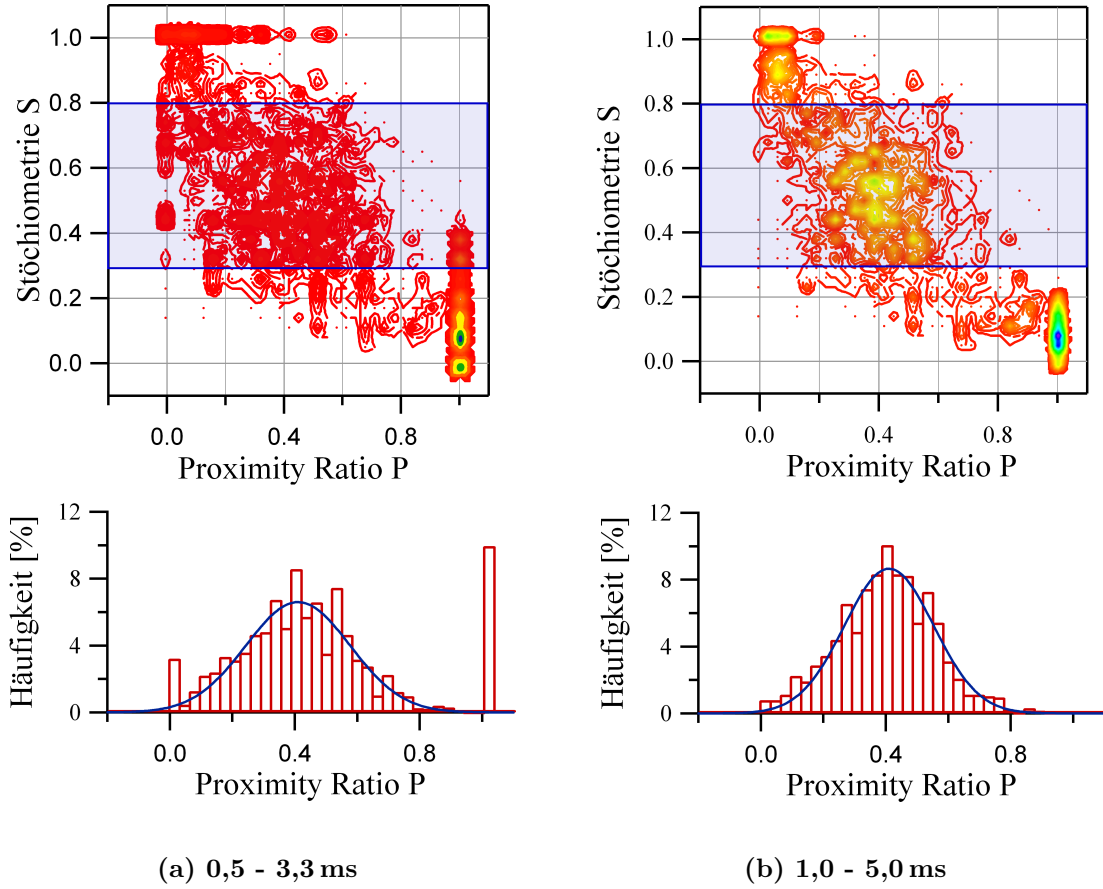


Abbildung 5.7: Vergleich der P-S-Diagramme und der entsprechenden Verteilung der Proximity Ratio für den erlaubten Bereich der Burstlängen von 0,5 - 3,3 ms und 1,0 - 5,0 ms. Im ersten Fall liegt das Maximum bei $P_{max} = 0,399 \pm 0,018$ bei einer Breite von $0,234 \pm 0,036$, im zweiten Fall ist das Maximum bei $P_{max} = P = 0,392 \pm 0,009$, die Breite beträgt $0,200 \pm 0,016$.

in Abbildung 5.6 hingegen die Verteilung der Photonenzahl dargestellt. Wird die untere Grenze zu niedrig gewählt, so bezieht man in die Auswertung viele Bursts mit niedriger Photonenzahl ein. Zwischen den Messungen mit den Obergrenzen 5 und 8 ms ist praktisch kein Unterschied zu erkennen.

Je höher die obere Grenze gesetzt wird, desto wahrscheinlicher ist es, dass nacheinander zwei Moleküle durch den Fokus diffundieren, jedoch nur als ein einzelnes detektiert werden. Haben Donor und Akzeptor bei diesen Molekülen unterschiedliche Abstände, so misst man eine mittlere Proximity Ratio anstatt derjenigen der einzelnen Moleküle.

In Abbildung 5.7 sind die Histogramme der Proximity Ratio und das zugehörige P-S-Diagramm für die Grenzen der Dauer von 0,5 - 3,3 ms und 1,0 - 5,0 ms gegenübergestellt. Die Histogramme der Proximity Ratio der drei Messungen mit Untergrenze 1,0 ms sind in ihrer Form sehr ähnlich. Im Diagramm der Messung mit der Untergrenze

0,5 ms kommt eine ausgeprägte A_{only} -Spitze hinzu, welche von einer Ausdehnung der Stöchiometriefaktoren nur akzeptormarkierter Teilchen zu höheren Werten herrührt, wie am P-S-Diagramm zu erkennen ist. Zudem sieht das P-Histogramm auf Grund der geringeren Photonenstatistik weniger glatt aus. Passt man jedoch eine Gauss-Verteilung an das Histogramm an, so ergibt sich für alle vier Parametersätze praktisch dieselbe mittlere Proximity Ratio und eine fast gleich breite Verteilung. Die Unsicherheit bei der Bestimmung des Maximums ist bei Burstlängen zwischen 0,5 und 3,3 ms ($P_{max} = 0,399 \pm 0,018$, Breite: $0,234 \pm 0,036$) jedoch deutlich größer als bei Längen zwischen 1,0 und 5,0 ms ($P_{max} = P = 0,392 \pm 0,009$, Breite: $0,200 \pm 0,016$).

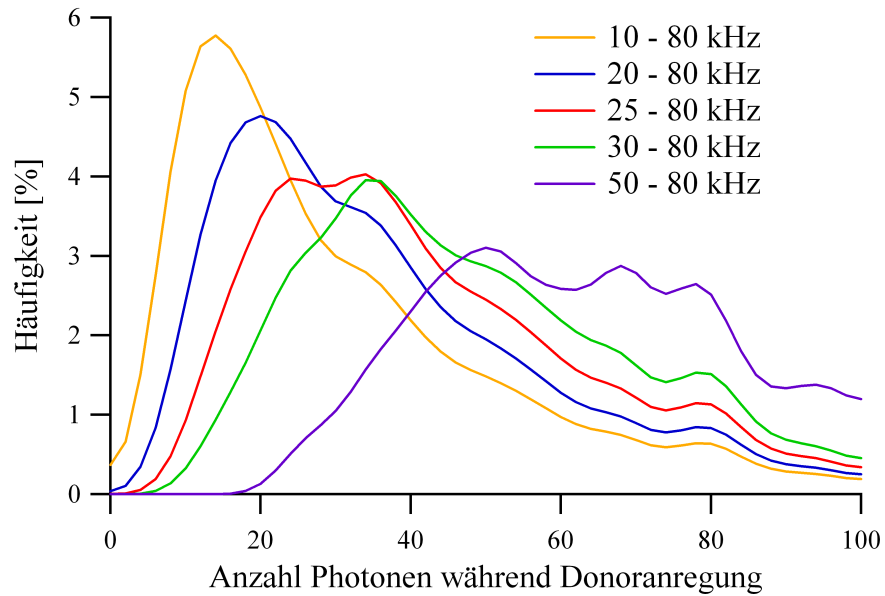
Anhand dieser Analyse ist der Bereich der erlaubten Burstlängen von 1,0 - 5,0 ms im Falle dieser Probe ein guter Kompromiss zwischen maximaler Photonenstatistik und einer geringen Wahrscheinlichkeit, dass ein Burst von zwei nacheinander durch den Detektionsfokus diffundierenden Molekülen erzeugt wird. Dies bestätigt auch die Annahme in Kapitel 4.3, dass sich die Burstanalyse auf Basis der gesamten Burstlänge besser zur Datenauswertung eignet. Bei Burstlängen unterhalb von 8 ms liefert dieser mehr Photonen pro Burst.

Einfluss der erlaubten Photonenrate

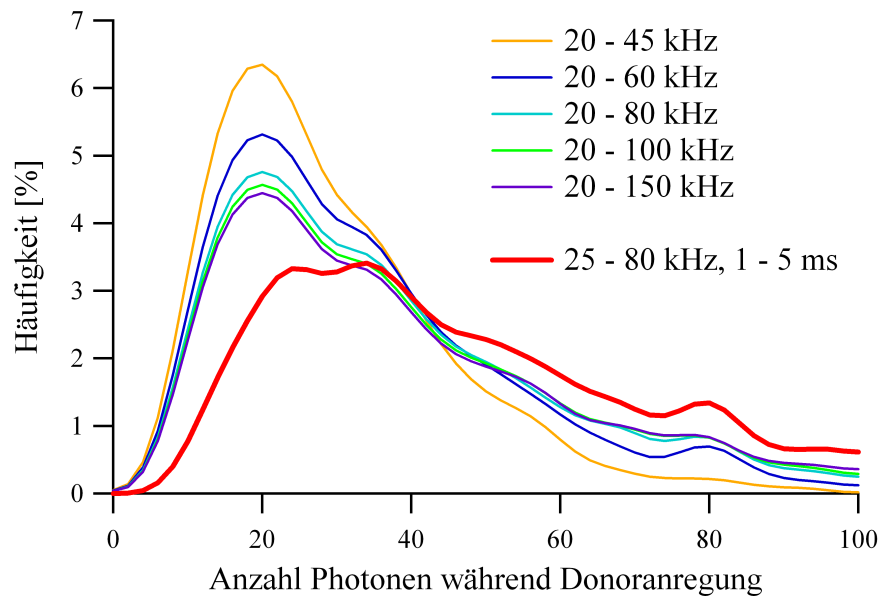
Die Photonenrate, das heißt die mittlere Frequenz der eintreffenden Photonen während eines Bursts, sollte innerhalb definierter Grenzen liegen, die eine möglichst gute Photonenstatistik und möglichst viele Bursts ergeben. Gleichzeitig sollte die Wahrscheinlichkeit minimal sein, dass sich zwei Teilchen gleichzeitig im Fokus aufhalten. Bei allen gemessenen Kombinationen von oberer und unterer Grenze der Photonenrate liegt die Burstlänge zwischen 1,0 und 3,3 ms.

Es wurde zunächst der Einfluss der unteren Grenze bei konstanter Obergrenze von 80 kHz betrachtet (Tabelle 5.3 oberer Teil). Bei einer niedrig angesetzten Untergrenze für die Photonenrate erfasst man eine große Zahl an Bursts, während die durchschnittliche Photonenzahl pro Burst allerdings niedrig ist. Je höher die untere Grenze gesetzt wird, desto weniger Ereignisse werden detektiert, gleichzeitig steigt aber auch die mittlere Photonenzahl. Dieser Sachverhalt ist grafisch in Abbildung 5.8(a) dargestellt, in der die relative Häufigkeit der Bursts in Abhängigkeit von der Photonenzahl, welche während des Donorpulses aufgenommen werden, gezeigt ist. Je höher die untere Grenze ist, desto mehr verlagert sich die Kurve hin zu höheren Photonenzahlen, während sie flacher und breiter wird.

Wird die untere Grenze bei 20 kHz festgehalten, so kann man der Einfluss der oberen Grenze auf die Photonen- und Burstzahl erkennen. Im mittleren Teil von Tabelle 5.3 sind die Auswertungsdaten für vier verschiedene Obergrenzen und in Abbildung 5.8(b) die Verteilung der Photonenzahl auf die Bursts für diese Reihe aufgelistet. Oberhalb von 80 kHz verändern sich die Burstzahl und die mittlere Anzahl erfasster Photonen nur noch wenig. Im Dauerstrichbetrieb des Donorlasers ergab sich bei einer FCS-Messung



(a) Variation der unteren Grenze



(b) Variation der oberen Grenze

Abbildung 5.8: Die Abhängigkeit der Photonenzahl pro Burst von den Grenzen für die Photonenrate. Im oberen Diagramm ist die Obergrenze bei 80 kHz festgelegt und die untere Grenze wird variiert; im unteren Diagramm wird die obere Grenze bei konstanter Untergrenze variiert. Zudem ist im unteren Graphen die Photonenverteilung für die in beiden Abschnitten als optimal für diese Probe bestimmte Parameterkombination gezeigt: Burstdauer 1 - 5 ms und Photonenrate 25 bis 80 kHz.

| Bereich der Photonenrate | Bursts gesamt | Bursts im Bereich $0,3 < S \leq 0,8$ | durchschnittliche Photonenzahl |
|-----------------------------|---------------|---|-----------------------------------|
| 10 - 80 kHz | 3944 | 50% | 33,69 |
| 20 - 80 kHz | 2379 | 63% | 40,05 |
| 25 - 80 kHz | 1700 | 65% | 46,83 |
| 30 - 80 kHz | 1259 | 65% | 53,46 |
| 50 - 80 kHz | 413 | 72% | 73,34 |
| 20 - 45 kHz | 1825 | 61% | 29,86 |
| 20 - 80 kHz | 2379 | 63% | 40,05 |
| 20 - 100 kHz | 2450 | 64% | 42,61 |
| 20 - 150 kHz | 2496 | 64% | 44,68 |
| 25 - 80 kHz, 1 - 5 ms | 1988 | 66% | 56,29 |

Tabelle 5.3: Die Anzahl an Ereignissen und die durchschnittliche Photonenzahl der unterschiedlichen Begrenzungen der Frequenz der detektierten Photonen. Zusätzlich sind die Werte für den optimalen Parametersatz von einer Photonenrate zwischen 25 - 80 kHz und einer Länge der Bursts zwischen 1,0 - 5,0 ms gezeigt.

eine Photonenrate von ungefähr 80 kHz pro Teilchen. Auf Grund unterschiedlicher Totzeiten der Messkarten sind die Werte der FCS-Messung zwar nicht direkt mit der Zählrate bei Einzelmolekülmessungen vergleichbar, geben aber doch einen Hinweis auf deren Größenordnung. Bei der Anregungssequenz 200–25–50–25 wird die Probe nur 67% der Gesamtzeit mit dem Donorlaser bestrahlt, was bedeutet, dass die Teilchen im Mittel Photonen mit einer Frequenz von 53 kHz aussenden. Die ermittelten Daten legen nahe, dass die obere Grenze ungefähr 50% über der durchschnittlichen Photonenfrequenz liegen kann, ohne dass eine merkliche Zahl von Ereignissen mit mehr als einem Teilchen im Fokus in die Auswertung einbezogen werden.

Als Kompromiss für die Begrenzungen der Photonenrate ergibt diese Analyse eine Untergrenze von 25 kHz und eine Obergrenze von 80 kHz. Bei dieser Kombination erhält man genügend Ereignisse, bei denen jeweils eine ausreichende Zahl an Photonen bei Donoranregung detektiert werden. Gleichzeitig minimiert man die Wahrscheinlichkeit, dass ein Burst von mehr als einem Teilchen im Fokus herbeigeführt wird.

In Kombination mit den Erkenntnissen des vorherigen Abschnitts findet man für die in dieser Analyse verwendete Probe und für die eingangs erwähnte Zielsetzung ein Optimum für die Parameter, welche die Auswahlkriterien der Bursts darstellen: Die Burstlänge liegt zwischen 1,0 und 5,0 ms und die Photonenrate zwischen 25 und 80 kHz. Für diesen Parametersatz ist in Abbildung 5.8(b) zusätzlich die Verteilung der Photonen pro Burst eingezeichnet und in Abbildung 5.9 die zweidimensionale Darstellung der P- und S-Werte sowie das Histogramm der Proximity Ratio gezeigt. Im folgenden Kapitel wird also die Burstlänge zwischen 1,0 und 5,0 ms und die Photonenrate zwischen 25 und 80 kHz festgelegt.

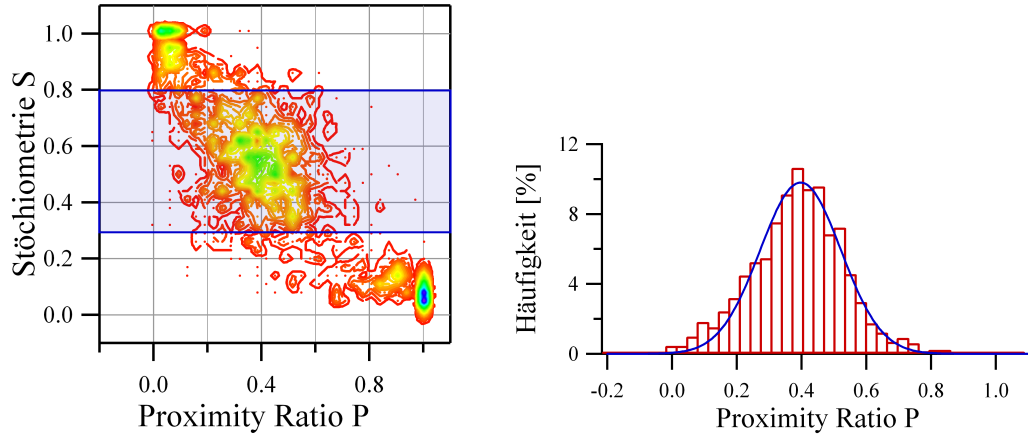


Abbildung 5.9: Das P-S-Diagramm und das Histogramm der Proximity Ratio für den in diesem Fall als optimal gefundenen Parametersatz zur Burstselektion: Burstlänge zwischen 1,0 und 5,0 ms, Photonenrate zwischen 25 und 80 kHz. Der Maximalwert der Proximity Ratio liegt bei $P_{max} = 0,397 \pm 0,005$, die Breite beträgt $0,176 \pm 0,009$.

Es sei an dieser Stelle jedoch noch einmal darauf hingewiesen, dass die Grundaussagen der hier durchgeführten Analyse zur Burstauswahl allgemeine Gültigkeit hat. Die absoluten Zahlenwerte jedoch hängen stark vom vermessenen System ab. Sie müssen daher für jede Fragestellung individuell angepasst werden.

5.4.2 Vergleich unterschiedlicher Anregungssequenzen

Anhand einer intern markierten Nukleosomenprobe, deren FRET-Effizienz im mittleren Bereich liegt, wurde der Einfluss unterschiedlicher Anregungssequenzen untersucht. Für alle Messungen wurde, wie im vorherigen Kapitel dargelegt, die Burstlänge zwischen 1,0 und 5,0 ms und die Grenzen der Photonenrate zwischen 25 und 80 kHz einheitlich festgesetzt.

Die unterschiedliche Dauer der Laserbestrahlung pro Alternierungsperiode bei den verschiedenen Anregungssequenzen muss bei der Auswertung berücksichtigt werden. Dafür wurde die Schwelle der Photonenzahl entsprechend angepasst, ab der eine Periode als Teil eines Bursts gewertet wird.

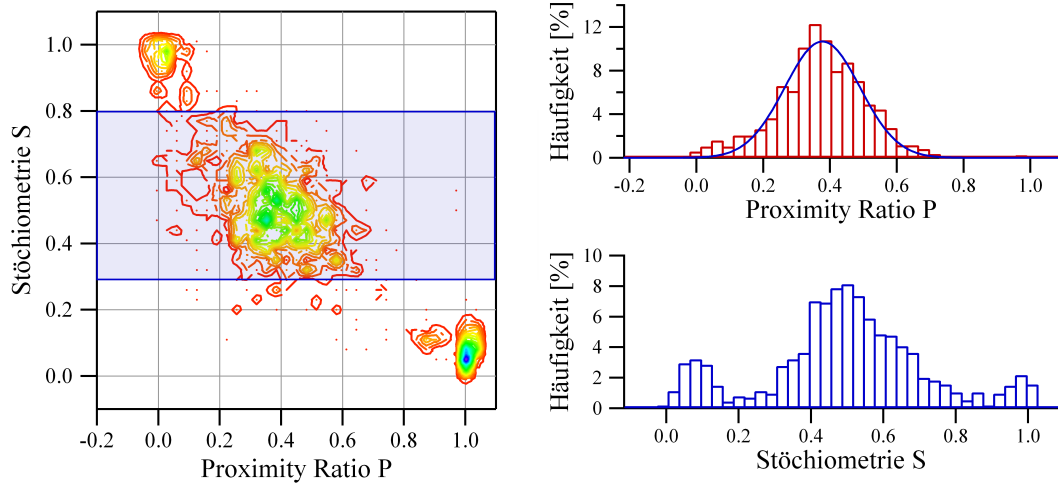
In der Regel möchte man die Stöchiometriefaktoren S für FRET-aktive Proben um den Wert $S = 1/2$ verteilen. Wenn man unterschiedlich lange Pulssequenzen für Donor- und Akzeptorlaser verwendet, muss man dieses Verhältnis entweder durch eine entsprechende Anpassung der Laserleistung oder durch einen Skalierungsfaktor ausgleichen, welcher die Zahl der Photonen während der Akzeptoranregung entsprechend der Zahl bei Donoranregung anpasst. Bei der in diesem Abschnitt beschriebenen Messungen wurde die Leistung beider Laserlinien am Objektiv jeweils konstant bei $100 \mu\text{W}$ gehalten, um den Einfluss der softwareseitigen Skalierung zu untersuchen.

Bei der Wahl des Skalierungsfaktors sind zwei Dinge zu beachten. Zum einen erhöht sich mit steigendem Skalierungsfaktor der Anteil an erfassten A_{only} -Spezies. Der Faktor sollte demnach so gewählt werden, dass es noch nicht zu dieser Betonung der A_{only} -Teilchen kommt. Durch den niedriger angesetzten Skalierungsfaktor verschiebt sich jedoch auch die Verteilung der Stöchiometriefaktoren hin zu höheren Werten. Zum anderen muss man insbesondere bei kurzen Periodenlängen in Verbindung mit einem großen Verhältnis der Dauer von Donor- zu Akzeptoranregung darauf achten, dass der Skalierungsfaktor nicht größer ist als die geforderte Mindestzahl an Photonen je Alternierungsperiode. In einem solchen Fall würden einzelne Rauschphotonen so sehr verstärkt, dass sie oberhalb der Mindestphotonenzahl je Periode liegen und somit als Teil eines Bursts angesehen werden. Damit ist keine saubere Trennung von Signal und Untergrund mehr möglich. Die jeweils zur Auswertung verwendete Mindestzahl an Photonen pro Anregungsperiode sowie der Skalierungsfaktor sind in Tabelle 5.4 aufgeführt.

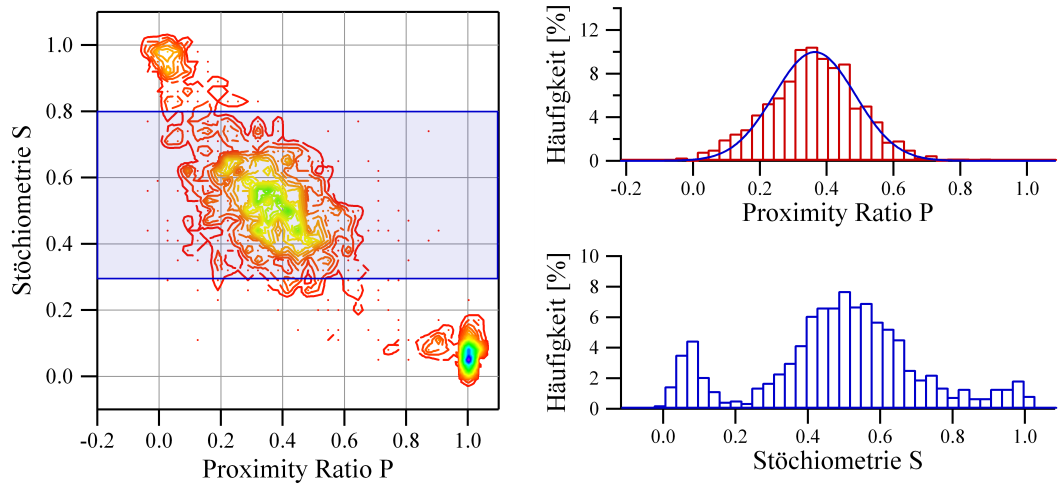
Um die FRET-aktiven Spezies für die Bestimmung der Proximity Ratio P von den einfach markierten Proben zu trennen, erwies sich bei den Sequenzen mit gleich oder nur wenig unterschiedlich langen Laserpulsen der Bereich des S-Raums zwischen 0,3 und 0,8 als geeignet. Trotz der Verschiebung der S-Werte bei den Sequenzen mit stark unterschiedlich langen Pulsen ließen sich die FRET-aktiven Bursts gut von jenen der einfach markierten Teilchen trennen. Für diese Fälle wurde somit ein erweiterter Bereich des S-Raums gewählt, um dennoch alle FRET-Ereignisse in die Auswertung einfließen zu lassen. Für alle Anregungssequenzen ist in Tabelle 5.4 der für die Bestimmung der Proximity Ratio betrachtete Bereich des S-Raums sowie die Burstzahl in diesem Bereich und deren relativer Anteil an der Gesamtzahl der Bursts angegeben.

Die Photonenraten wurden für diese Untersuchung um Übersprechen, direkte Anregung und Hintergrundrauschen korrigiert. Die Dauer jeder Messung betrug 10 min.

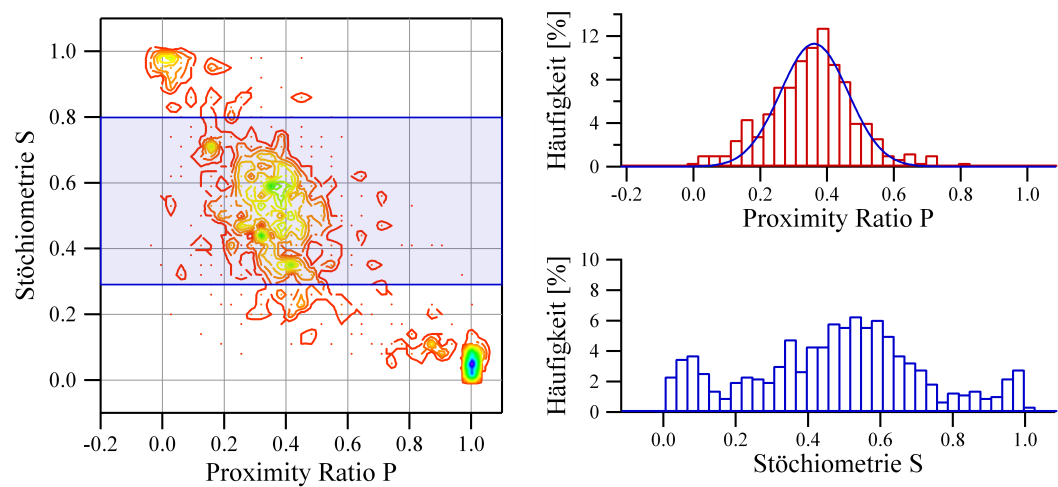
Die Anzahl Bursts von doppelt markierten Teilchen hängt von der Anregungssequenz ab. Dies liegt einerseits daran, dass die Grenzen der Burstlänge für alle Messungen gleich waren. Zur Datenauswertung kann man zwar beliebige Zeiten angeben, die Burstlänge wird innerhalb der Analysesoftware aber nur in Vielfachen der Periodenlänge betrachtet. Dadurch kommt es dazu, dass die effektiv registrierte Burstlänge von der Sequenz selbst abhängt und damit auch die Anzahl an erfassten Ereignissen. Zum anderen musste aus oben erläuterten Gründen bei Sequenzen mit hohem Skalierungsfaktor die Mindestzahl an Photonen pro Alternierungsperiode höher gesetzt werden, was dazu führte, dass deutlich weniger Bursts die Kriterien zur Burstselektion erfüllten. Zudem spielt natürlich der gewählte Bereich des S-Raums eine entscheidende Rolle für die Burstzahl.



(a) 50–25–50–25



(b) 100–25–100–25



(c) 400–75–400–75

Abbildung 5.10: Die P-S-Diagramme und die zugehörigen Verteilungen der Proximity Ratio P und des Stöchiometriefaktors S für verschiedene Anregungssequenzen mit gleich langer Donor- und Akzeptoranregung.

| Anregungssequenz | Skalierungs- faktor | Mindestzahl an Photonen pro Periode | Beschränkung des S-Raums | Bursts im FRET-Bereich | Anteil Bursts im FRET-Bereich |
|------------------|------------------------|---|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 50–25–50–25 | 1,3 | 2 | 0,3 - 0,8 | 881 | 76% |
| 100–25–100–25 | 1,3 | 3 | 0,3 - 0,8 | 964 | 74% |
| 400–75–400–75 | 1,4 | 16 | 0,3 - 0,8 | 572 | 67% |
| 400–45–10–45 | 15,0 | 16 | 0,3 - 0,95 | 535 | 72% |
| 400–40–20–40 | 10,0 | 11 | 0,3 - 0,95 | 949 | 72% |
| 400–25–50–25 | 8,0 | 9 | 0,3 - 0,9 | 1124 | 62% |
| 400–25–100–25 | 5,0 | 10 | 0,3 - 0,8 | 1300 | 57% |
| 400–50–200–50 | 2,7 | 13 | 0,3 - 0,8 | 1023 | 64% |
| 200–25–50–25 | 5,0 | 6 | 0,3 - 0,8 | 1160 | 60% |
| 1000–75–50–75 | 10,0 | 32 | 0,3 - 0,95 | 1051 | 53% |
| 2000–125–50–125 | 17,0 | 60 | 0,3 - 0,95 | 634 | 52% |

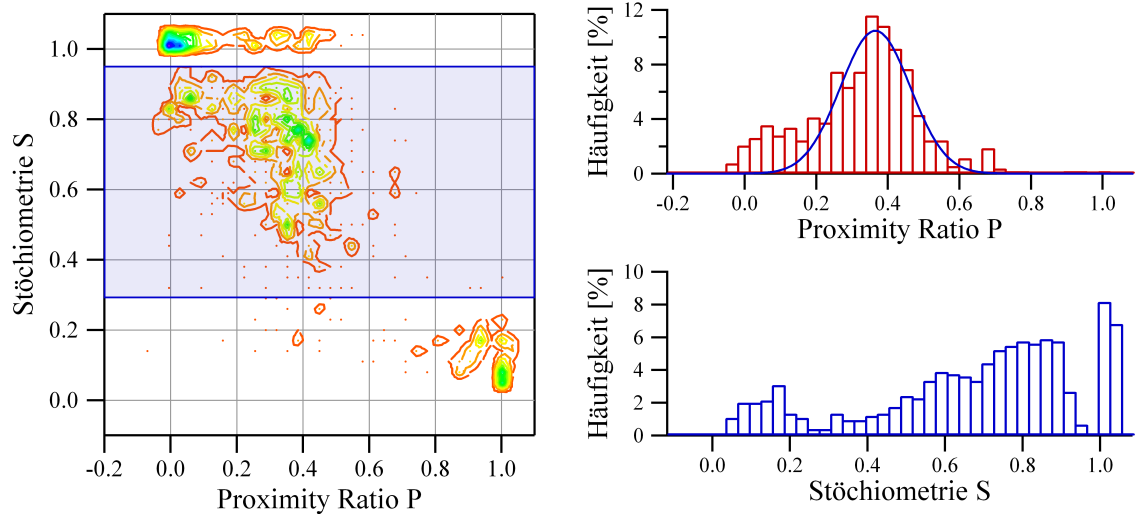
Tabelle 5.4: Die zur Auswertung der Messdaten verwendeten Parameter für die Burstauswahl und der für die Bestimmung der Proximity Ratio betrachteten Bereich des S-Raums. Für den jeweils verwendeten Parametersatz ist für jede Sequenz die Anzahl der Bursts im betrachteten Bereich des S-Raums sowie deren relativer Anteil an allen Ereignissen angegeben.

Einfluss der Anregungssequenz auf die Verteilung der S-Werte und die P-S-Diagramme

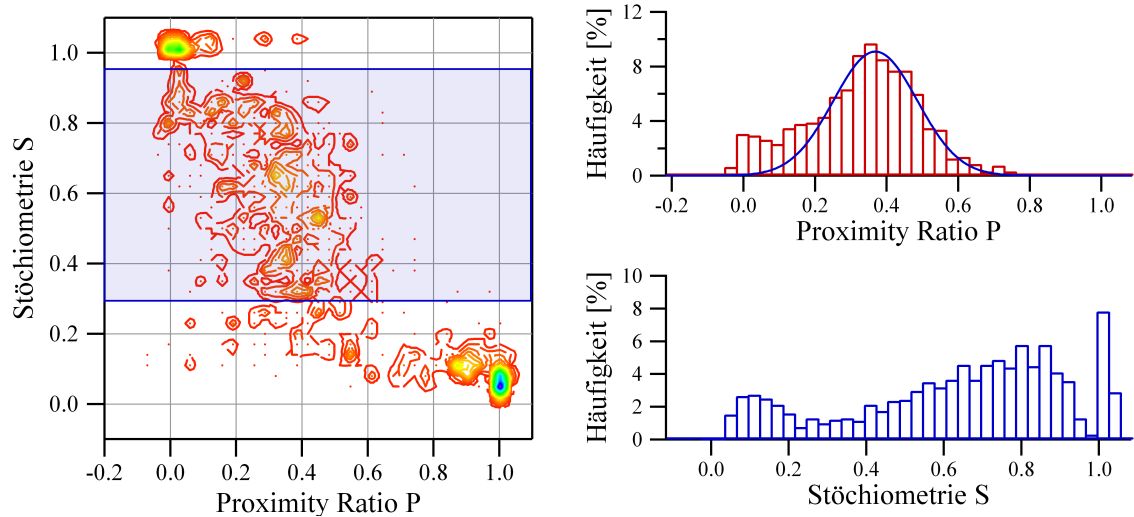
Zunächst wurden Anregungssequenzen verglichen, bei denen die Pulse für Donor- und Akzeptoranregung jeweils gleiche Länge haben: 50–25–50–25, 100–25–100–25 und 400–75–400–75. In Tabelle 5.4 sind die Daten zu diesen Sequenzen im oberen Block zu finden. Die Anzahl an Ereignissen im Bereich $0,3 < S \leq 0,8$ und der Anteil der FRET-aktiven Teilchen der ersten beiden Sequenzen ist sehr ähnlich. Bei der Sequenz 400–75–400–75 liegt sowohl der relative Anteil FRET-aktiver Moleküle als auch die Gesamtzahl der Bursts darunter.

Abbildung 5.10 zeigt für diese Anregungssequenzen die P-S-Diagramme mit den zugehörigen Verteilungen der Proximity Ratio P in rot und der Stöchiometriefaktoren S in blau. Die Verteilung der Bursts im P-S-Diagramm ist sehr ähnlich, ebenso die Verteilung der Proximity Ratio. Das S-Histogramm der Sequenz 400–75–400–75 ist etwas breiter verteilt als das der anderen beiden Sequenzen. Der Anteil einfach markierter Moleküle ist für alle Messungen gering. Dies sieht daran, dass nur wenige Bursts mit S-Werten um null bzw. eins detektiert wurden.

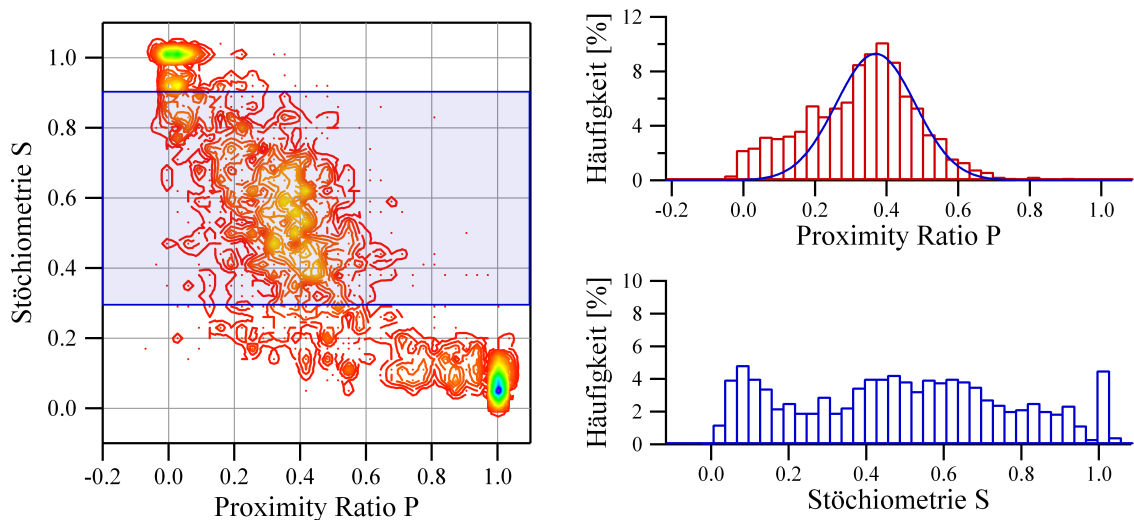
Für die Anregungssequenzen mit konstanter Länge des Donorpulses von $400 \mu\text{s}$ und



(a) 400-45-10-45

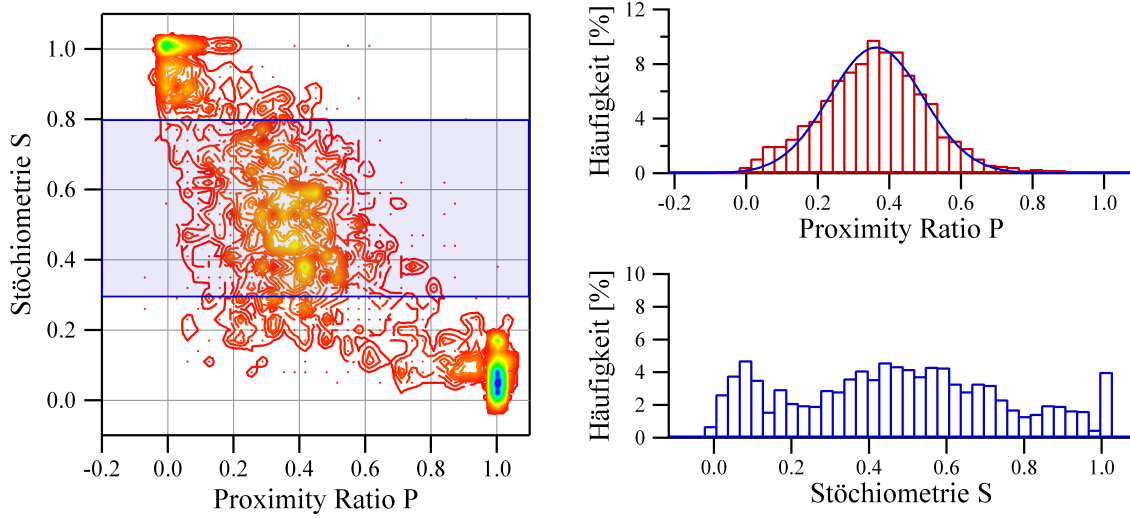


(b) 400-40-20-40

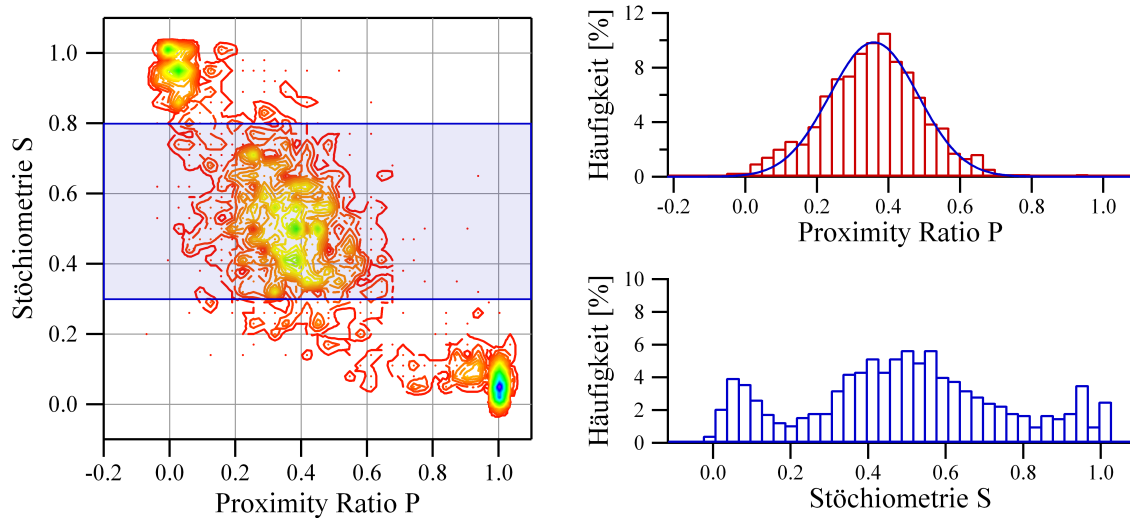


(c) 400-25-50-25

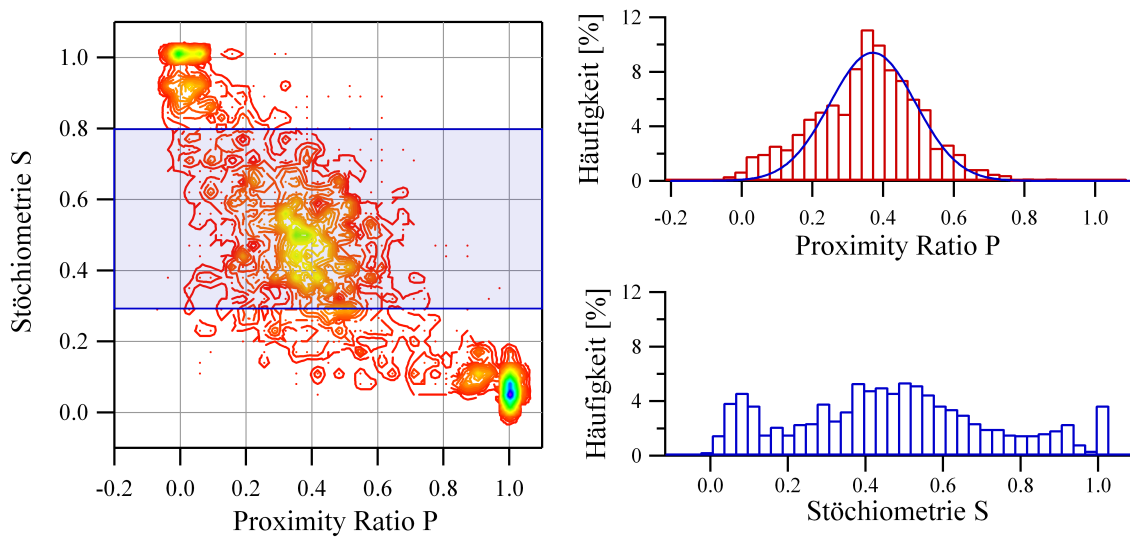
Abbildung 5.11: Die P-S-Diagramme und die zugehörigen Verteilungen der Proximity Ratio P und des Stöchiometriefaktors S für die Sequenzen 400-45-10-45, 400-40-20-40 und 400-25-50-25.



(a) 400–25–100–25



(b) 400–50–200–50



(c) 200–25–50–25

Abbildung 5.12: Die P-S-Diagramme und die zugehörigen Verteilungen der Proximity Ratio P und des Stöchiometriefaktors S für die Sequenzen 400–25–100–25, 400–50–200–50 und 200–25–50–25.

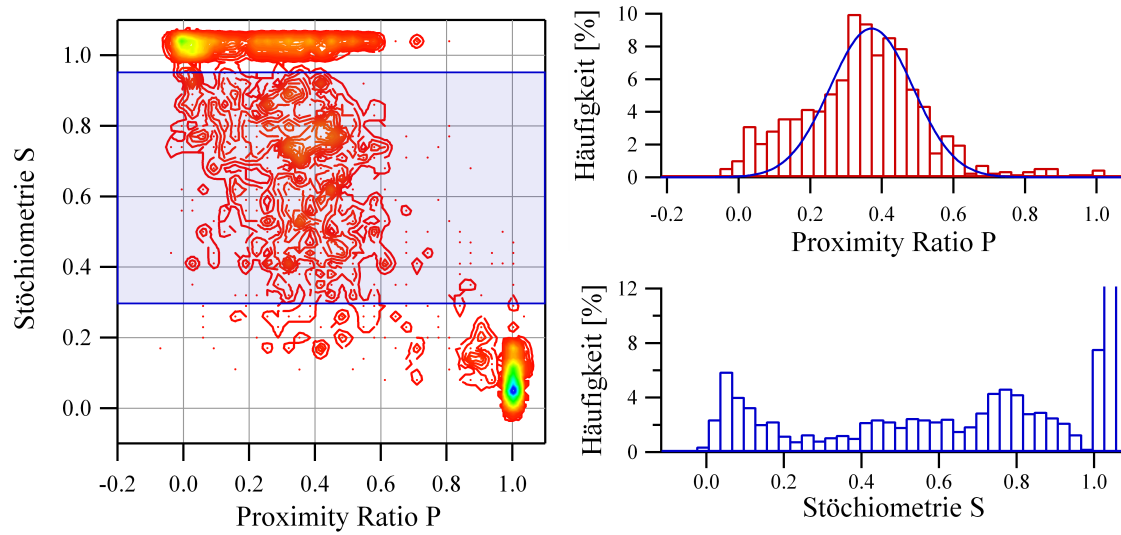
unterschiedlichen Längen des Akzeptorpulses von 10, 20, 50, 100, und 200 μs entnimmt man die Auswahlkriterien für die Bursts und deren Anzahl dem mittleren Block von Tabelle 5.4. Diejenigen der oft in dieser Arbeit verwendeten Sequenz 200–25–50–25 und der sehr langen Anregungsperioden 1000–75–50–75 und 2000–125–50–125 stehen ganz unten. Bei den Sequenzen 400–45–10–45 und 400–40–20–40 ist die Burstzahl sehr gering, da bei diesen Sequenzen die Mindestzahl an Photonen aufgrund des Skalierungsfaktors deutlich höher gesetzt werden musste, als dies allein aufgrund der Periodenlänge geschehen wäre. Auch für die Sequenz 400–25–50–25 wurde die Schwelle der Photonenanzahl leicht nach oben gesetzt. Bei diesen Sequenzen musste, ebenfalls wegen des hohen Skalierungsfaktors, der Auswahlbereich des S-Raums erweitert werden, um alle FRET-aktiven Teilchen zu berücksichtigen. Für die großen Periodenlängen wurde ebenfalls der FRET-Bereich des S-Raums erweitert.

In Abbildung 5.11 sind die P-S-Diagramme und die Verteilung von P und S für die Sequenzen 400–45–10–45, 400–40–20–40 und 400–25–50–25 dargestellt, in Abbildung 5.12 diejenigen der Sequenzen 400–25–100–25, 400–50–200–50 und 200–25–50–25. Bei den ersten beiden Sequenzen in Abbildung 5.11 erkennt man am S-Histogramm deutlich die Verschiebung hin zu höheren Stöchiometriefaktoren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein geringerer Skalierungsfaktor verwendet wurde, als es der große Unterschied der Längen der Anregungspulse verlangte (wie auf Seite 52 diskutiert wurde).

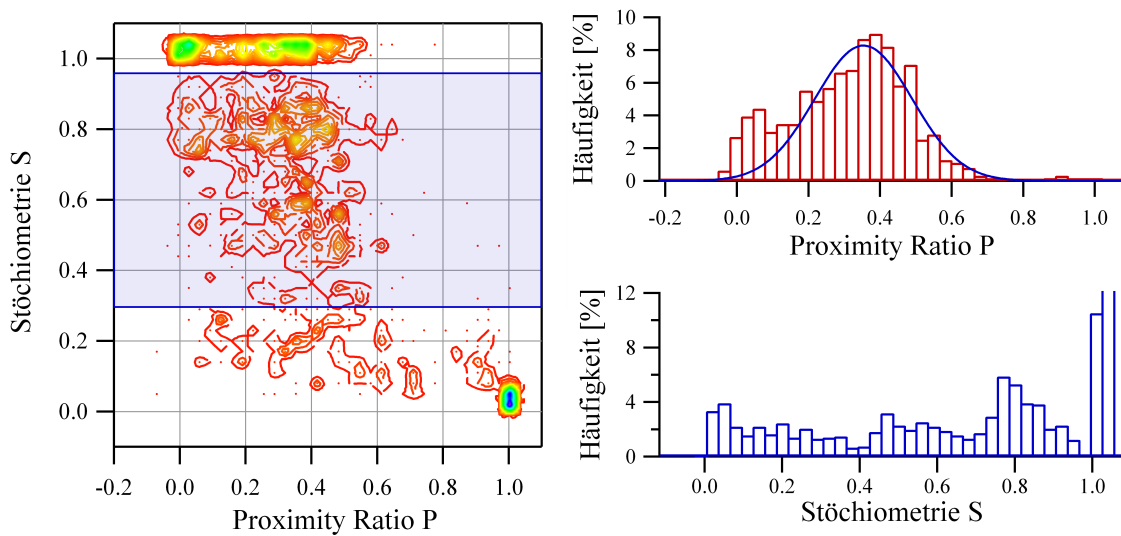
Die Verteilung der Stöchiometriefaktoren S der Sequenzen mit fester Länge der Donorpulse von 400 μs ist bei kurzen Akzeptorpulsen von 50 μs sehr breit. Je länger der Akzeptor direkt bestrahlt wird, desto mehr Bursts haben S-Werte um $S = 1/2$ und es bildet sich ein deutliches Maximum heraus.

Die S-Werte der langen Sequenzen 1000–75–50–75 und 2000–125–50–125 sind ebenfalls, wie in Abbildung 5.13 zu erkennen ist, auf Grund eines geringen Skalierungsfaktors zu höheren Stöchiometriefaktoren verschoben. Zudem scheint es in diesen Fällen Unterpopulationen zu geben; bei den Werten $S = 0,6$ und $S = 0,8$ erheben sich leichte Spitzen im S-Histogramm. Dies ist aber auf eine nur sehr geringe Zahl an Photonen zurückzuführen, welche während der Akzeptoranregung emittiert werden. Da diese durch den hohen Skalierungsfaktor stark betont werden, kommt es zu einer teilweise diskreten Verteilung im S-Raum.

Aus demselben Grund erkennt man bei allen Anregungssequenzen mit deutlich kürzerem Akzeptorlaserpuls ein Ausschmieren des D_{only} -Bereichs hin zu höheren P-Werten. Durch die Verstärkung einzelner Hintergrundphotonen im Akzeptorkanal erhöht sich scheinbar die Proximity Ratio. Eine systematische Verschiebung der maximalen Proximity Ratio ist allerdings nicht zu beobachten.



(a) 1000-75-50-75



(b) 2000-125-50-125

Abbildung 5.13: Die P-S-Diagramme und die zugehörigen Verteilungen der Proximity Ratio P und des Stöchiometriefaktors S für die sehr langen Sequenzen 1000-75-50-75 und 2000-125-50-125.

| Anregungssequenz | Maximum von P | Halbwertsbreite | χ^2 | Durschnittliche Photonenzahl pro Burst | Bestrahlzeit Donorlaser |
|------------------|------------------|-----------------|----------|--|----------------------------|
| 50-25-50-25 | 0,377 | 0,159 | 12,7 | 46,1 | 33% |
| 100-25-100-25 | 0,364 | 0,172 | 7,0 | 51,7 | 40% |
| 400-75-400-75 | 0,362 | 0,143 | 9,1 | 60,5 | 42% |
| 400-45-10-45 | 0,365 | 0,138 | 13,4 | 90,7 | 80% |
| 400-40-20-40 | 0,368 | 0,165 | 3,7 | 80,3 | 80% |
| 400-25-50-25 | 0,369 | 0,156 | 5,1 | 66,1 | 80% |
| 400-25-100-25 | 0,363 | 0,185 | 2,2 | 54,8 | 73% |
| 400-50-200-50 | 0,359 | 0,175 | 3,0 | 56,6 | 57% |
| 200-25-50-25 | 0,371 | 0,171 | 14,3 | 50,7 | 67% |
| 1000-75-50-75 | 0,371 | 0,164 | 10,6 | 65,5 | 83% |
| 2000-125-50-125 | 0,354 | 0,192 | 13,7 | 88,8 | 87% |

Tabelle 5.5: Die Daten zur Photonenstatistik und zur Bestimmung der Proximity Ratio über die Histogramm Daten. Die Werte des maximalen P, der Halbwertsbreite der Spitze und der quadratischen Abweichung χ^2 stammen von der Routine des Programms Igor Pro zum Anpassen einer Gaußkurve an die Verteilung von P. Zudem ist der Anteil der Bestrahlzeit an der Gesamtzeit aufgeführt.

Einfluss der Anregungssequenz auf die Verteilung der Proximity Ratio

Die zentrale Frage bei der Analyse der verschiedenen Pulssequenzen ist jedoch deren Einfluss auf die Verteilung der Proximity Ratio. Die Genauigkeit diese zu bestimmen hängt von zwei Faktoren ab: Von der Anzahl Bursts, welche berücksichtigt werden, vor allem aber von der Anzahl der Photonen, die zur Berechnung des P-Wertes eines einzelnen Bursts zur Verfügung stehen. In Tabelle 5.4 ist die Anzahl an Ereignissen angegeben, welche bei den einzelnen Sequenzen zur Bestimmung der Proximity Ratio herangezogen werden. Tabelle 5.5 zeigt die durchschnittliche Photonenzahl während der Donoranregung und die Ergebnisse der Analyse der Verteilung der P-Werte. Bei dieser Analyse wurde eine Gaußkurve an die Verteilung der Proximity Ratio der einzelnen Bursts angepasst und anhand dieser das Maximum sowie die Breite der Verteilung bestimmt. Ein Maß für die Genauigkeit, mit der die Kurve an die Daten angepasst werden konnte, bietet die mittlere quadratische Abweichung χ^2 .

Beim Anpassen der Gaußkurve wurden nur P-Werte zwischen 0,2 und 0,6 berücksichtigt. Dies verhindert, dass bei Sequenzen mit hohem Skalierungsfaktor die Schulter bei einer niedrigen Proximity Ratio in die Analyse einfließt. Unabhängig von der Anregungssequenz unterscheidet sich die Position des Maximums der P-Verteilung nur

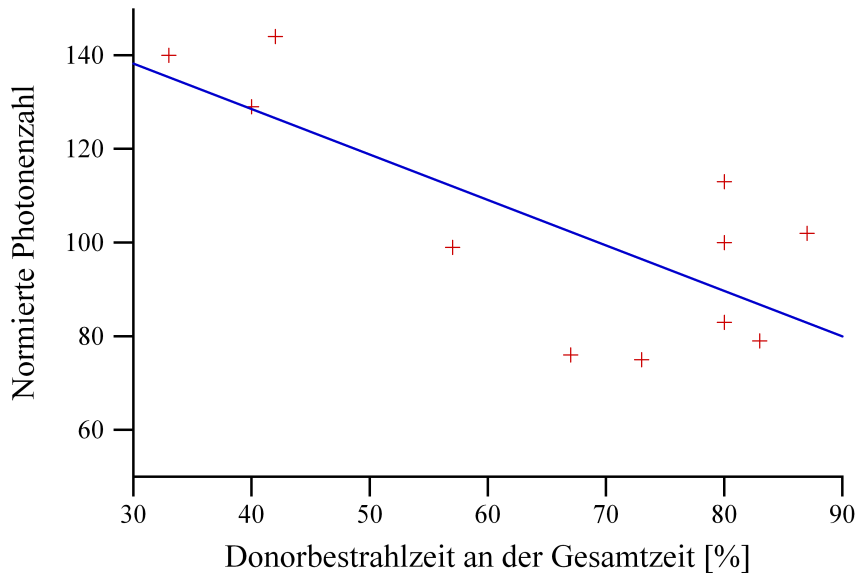


Abbildung 5.14: Für die Donoranregung ist die auf die Gesamtzeit normierte mittlere Photonenzahl pro Burst in Abhängigkeit von der Dauer des Donorpulses an der Gesamtzeit.

unwesentlich. Die Halbwertsbreiten variieren allerdings um ca. 30%. Ebenso zeigen sich bei der mittleren quadratischen Abweichung χ^2 deutliche Unterschiede. Bei Sequenzen, die entweder eine niedrige Burstzahl haben oder deren durchschnittliche Photonenzahl gering ist, weicht die angepasste Gausskurve stark von der Verteilung der Proximity Ratio ab. Dies sind einerseits die Sequenzen mit gleich langer Donor- und Akzeptoranregung (geringe Photonenzahl während Donoranregung) und andererseits die Sequenz 400–45–10–45 (geringe Burstzahl aufgrund hoher Mindestphotonenzahl pro Alternierungsperiode).

Es fällt auf, dass die Sequenz 400–40–20–40 trotz eines starken Skalierungsfaktors von 10 eine sehr geringe mittlere quadratische Abweichung χ^2 von 3,7 hat. Dies mag daran liegen, dass sie eine sehr gute Photonenzahlstatistik aufweist (im Mittel kann auf 80 Photonen zur Berechnung der Proximity Ratio zurückgegriffen werden) und andererseits eine relativ hohe Zahl an Bursts im Bereich der FRET-aktiven Spezies aufweist.

Idealerweise steigt die durchschnittlich detektierte Photonenzahl pro Burst proportional mit der Bestrahlzeit. Um dies für die Donoranregung zu überprüfen, wurde in Abbildung 5.14 für jede Anregungssequenz die Bestrahlzeit (siehe Tabelle 5.5) gegen die Zahl der detektierten Photonen aufgetragen. Die durchschnittliche Photonenzahl wurde dabei auf eine Bestrahlzeit von 100% normiert. Je länger der Donorlaser aktiv war, desto geringer ist die durchschnittliche normierte Photonenzahl. Dies kann daran liegen, dass bei zunehmender Laserintensität der Donorfarbstoff öfter in den Tripletzustand übergeht und für eine gewisse Zeit keine Photonen mehr aussendet. Abhängig vom verwendeten Farbstoff steigt zudem die Wahrscheinlichkeit, dass der Donor aus-

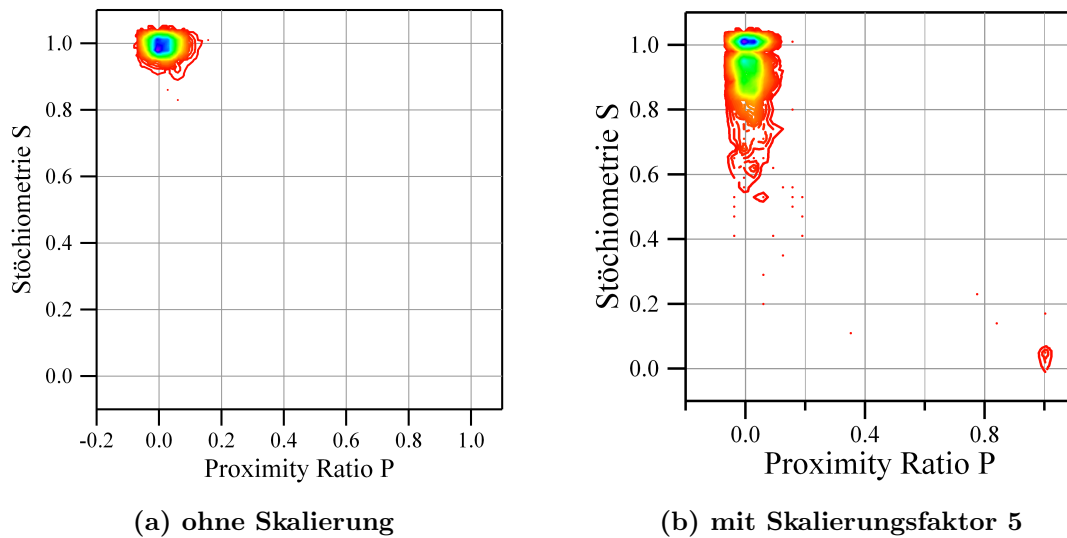


Abbildung 5.15: Einfluss der softwareseitigen Skalierung auf eine D_{only} -Probe, links ohne Skalierung und rechts mit einem Skalierungsfaktor von 5.

bleicht und dadurch die Detektionszeit und somit die Photonenzahl sinkt.

Mit zunehmendem Verhältnis der Längen von Donor- zu Akzeptoranregung entsteht eine Schulter bei niedrigen Werten der Proximity Ratio. Die Vermutung, ein Teil der Nukleosomen wäre mit der Zeit zerfallen und es handle sich hierbei um freie DNA, bestätigt sich nicht, wenn man die Reihenfolge betrachtet, in der die Messungen durchgeführt wurden. So wurden die Daten der Sequenzen 400–25–100–25 und 400–50–200–50 nach denen der Sequenzen 400–25–50–25, 1000–75–50–75 und 2000–125–50–125 aufgezeichnet, doch erstere zeigen eine deutlich geringere Schulter als die Sequenzen mit höherem Skalierungsfaktor. Betrachtet man dazu auch das P-S-Diagramm der Sequenz 400–25–50–25 in Abbildung 5.11 sowie jene der Sequenzen 400–25–100–25, 400–50–200–50 und 200–25–50–25 in Abbildung 5.12, so erkennt man unterhalb der deutlichen D_{only} -Ansammlung eine weitere Häufung. Dies ist ein Artefakt des Skalierungsfaktors. In Abbildung 5.15 ist das P-S-Diagramm einer mit der Sequenz 200–25–50–25 gemessenen D_{only} -Probe zu sehen. Links wurde keine Skalierung vorgenommen, rechts ein Faktor 5 verwendet. Deutlich ist bei der zweiten Darstellung die hinzugekommene Häufung unterhalb des D_{only} -Bereichs zu erkennen. Die Schulter in den Verteilungen der Proximity Ratio rührt also daher, dass ein Teil der D_{only} -Ereignisse in den Bereich mittlerer S-Werte ausschmiert. Dies ist umso trügerischer, als sich diese Häufung in den P-S-Diagrammen der Sequenzen mit großem Skalierungsfaktor deutlich vom D_{only} -Bereich abhebt. Dies verleitet dazu, den für die Auswertung der P-Werte betrachteten S-Raum zu erweitern. Dadurch aber lassen sich doppelt markierte Moleküle nicht mehr von welchen trennen, die nur den Donor oder nur den Akzeptor tragen.

Schlussbetrachtung zum Einfluss der Mess- und Analyseparameter

Auf die Bestimmung des Maximalwerts der Proximity Ratio hat die Anregungssequenz nahezu keinen Einfluss. Jedoch gibt es Unterschiede bei der statistischen Untermauerung der Ergebnisse. Bei Sequenzen mit gleich langen Donor- und Akzeptorpulsen bilden die Stöchiometriefaktoren ein deutliches Maximum um $S = 1/2$, jedoch erhält man bei diesen Anregungsmustern nur eine geringe Photonenzahl je Burst. Sequenzen mit deutlich längerer Donoranregung liefern zwar mehr Photonen pro Burst, weisen jedoch einige unangenehme Effekte auf. So wirkt sich die geringere Burstzahl auf Grund der höher zu setzenden Mindestphotonenzahl pro Burst negativ auf die Statistik aus. Insbesondere die Tatsache, dass es durch die softwareseitige Korrektur der Photonenzahlen durch den Skalierungsfaktor zu einem Ausschmieren der D_{only} -Proben in den mittleren S-Raum hinein kommt, lässt den Einsatz dieses Verfahrens sehr fragwürdig erscheinen. Denn durch diese Skalierung wird ein wesentlicher Vorteil der alternierenden Laseranregung gegenüber herkömmlichen Einzelmolekül-FRET-Messungen, nämlich die Möglichkeit der Trennung von einfach und doppelt markierten Molekülen, zunichte gemacht.

Aus diesem Grund ist es müßig, auf Grund dieser Analyse eine optimale Anregungssequenz zu empfehlen. Der Mechanismus der Korrektur der Photonenzahlen durch die Software unterwandert zu sehr die Vorteile, welche die Technik der alternierenden Laseranregung bietet. Sequenzen mit längerer Donorlaserbeleuchtung bieten grundsätzlich den Vorteil einer besseren Photonenzahlstatistik der einzelnen Bursts. Dieser ließe sich dennoch zunutze machen, wenn statt der Skalierung der Photonenzahl die Intensität des Akzeptorlasers erhöht wird. Auch wenn dies zu einem stärkeren Bleichen des Akzeptors führt, verspricht dieser Ansatz eine bessere Statistik und sollte in Zukunft verfolgt und charakterisiert werden.

5.5 Bestimmung relativer Anteile einfach und doppelt markierter Spezies

Mit alternierender Laseranregung ist es in einem gewissen Rahmen möglich, die relativen Anteile von einfach und doppelt markierten Molekülen in einem Gemisch zu bestimmen. Damit ist es z.B. möglich, den Markierungsgrad einer Probe zu ermitteln.

Für die in Kapitel 5.4.1 untersuchte Nukleosomenprobe wurden die relativen Anteile an A_{only} - ($0 < S \leq 0,3$), D_{only} - ($0,8 < S \leq 1$) und doppelt markierten Proben ($0,3 < S \leq 0,8$) bestimmt. Ausgehend von einer Anregungssequenz 100–25–100–25 (Skalierungsfaktor = 1,3; Mindestphotonenzahl pro Periode = 2), Burstlänge zwischen 1 und 5 ms und Photonennraten zwischen 25 und 80 kHz wurde jeweils einer der folgenden Parameter variiert:

1. Die untere Grenze der Burstlänge (0,5 - 5 ms statt 1 - 5 ms),
2. die obere Grenze der Burstlänge (1 - 3 ms statt 1 - 5 ms),

3. die untere Grenze der Photonenrate (10 - 80 kHz statt 25 - 80 kHz),
4. die obere Grenze der Photonenrate (25 - 40 kHz statt 25 - 80 kHz),
5. die Anregungssequenz (200-25-50-25, mit Skalierungsfaktor 5,0 und Mindestphotonenzahl pro Periode 6).

In Tabelle 5.6 sind die Ergebnisse aufgeführt. Der jeweils variierte Parameter ist rot hervorgehoben. Veränderungen der die Burstauswahl bestimmenden Größen haben nur einen geringen Einfluss auf die relativen Anteile der einzelnen Spezies. Verwendet man allerdings eine andere Anregungssequenz, so weichen die relativen Anteile deutlich voneinander ab.

Es ist denkbar, dass man mit Gemischen bekannter Zusammensetzung dieses Verfahren zur relativen Konzentrationsbestimmung für eine bestimmte Anregungssequenz eicht.

| Anregungssequenz | Untergrenze Burstlänge [ms] | Obergrenze Burstlänge [ms] | Untergrenze Photonenrate [kHz] | Obergrenze Photonenrate [kHz] | A_{only} | doppelt markiert | D_{only} |
|------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|------------|
| 100-25-100-25 | 1,0 | 5,0 | 25 | 80 | 18% | 74% | 8% |
| 100-25-100-25 | 0,5 | 5,0 | 25 | 80 | 20% | 71% | 9% |
| 100-25-100-25 | 1,0 | 3,0 | 25 | 80 | 20% | 72% | 8% |
| 100-25-100-25 | 1,0 | 5,0 | 10 | 80 | 20% | 68% | 12% |
| 100-25-100-25 | 1,0 | 5,0 | 25 | 40 | 21% | 68% | 11% |
| 200-25-50-25 | 1,0 | 5,0 | 25 | 80 | 27% | 60% | 13% |

Tabelle 5.6: Die relativen Anteile an A_{only} -, D_{only} - und doppelt markierten Spezies variieren nur gering bei Veränderung der Burstauswahlparameter. Die Anregungssequenz jedoch hat einen starken Einfluss auf das Ergebnis. Die oberste Zeile zeigt die Analyse mit den Ausgangsparametern (siehe Text). Der jeweils variierte Parameter ist in den folgenden Zeilen rot hervorgehoben.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Durch die Erweiterung der klassischen Einzelmolekül-FRET-Technik um alternierende Laseranregung ist es möglich, doppelt markierte Moleküle von solchen zu trennen, die nur einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Es lassen sich nur mit dem Donorfarbstoff markierte Proben von doppelt markierten unterscheiden, bei denen die Farbstoffe zu weit auseinander liegen, als dass ein Energietransfer stattfinden könnte. Dies ist mit herkömmlichen Einzelmolekül-FRET-Messungen kaum möglich. Außerdem kann man die Verteilung der Proximity Ratio P einzig auf Basis der FRET-aktiven Spezies erstellen.

In dieser Diplomarbeit wurde zunächst die Handhabung und Effizienz eines bestehenden Einzelmolekül-FRET-Spektrometers verbessert und dieses dann um alternierende Laseranregung ergänzt. Schließlich wurde diese Erweiterung eingehend charakterisiert.

Verbesserung von Handhabung und Effizienz

Die gleichen Anregungslaser werden von zwei Mikroskopen verwendet. Bisher konnten immer nur eines zur selben Zeit betrieben werden. Durch Auftrennung des Laserstrahls ist es nun möglich beide Geräte gleichzeitig zu benutzen.

Bisher sorgte ein nur teilweise reflektives Prisma des Mikroskops für einen Verlust sowohl bei der Anregungsleistung als auch bei der Intensität des Fluoreszenzsignals. Dieses wurde ersetzt durch eines, das vollständig reflektiert. Dadurch war es nicht mehr möglich, per Okular des Mikroskops den Anregungslaser korrekt zu justieren. Diese Arbeit übernimmt nun eine Kamera. Zusätzlich zur Erhöhung der Signalintensität ist die Justage des Geräts nun wesentlich benutzerfreundlicher.

Um das Mikroskop auf eine andere Anregungswellenlänge umzubauen, muss neben den Emissionsfiltern ein Strahlteiler (DC2 in Abbildung 3.1) ausgetauscht werden. Nach jedem Wechsel dieses Strahlteilers war eine konfokale Neujustage nötig. Bei der neuen, selbstentworfenen Fassung des Strahlteilers werden nun ungefasste Dichroite verwendet. Die Position der reflektierende Fläche ist damit jederzeit reproduzierbar. Dadurch geht ein Wechsel der Anregungswellenlänge nun wesentlich einfacher und schneller vonstatten.

Erweiterung um alternierende Laseranregung

Um mit dem Einzelmolekül-FRET-Spektrometer alternierende Laseranregung nutzen zu können war eine Erweiterung des Aufbaus nötig. Zum einen mussten die Laser in alternierender Weise geschaltet werden, zum anderen für jedes detektierte Fluoreszenzphoton bekannt sein, durch welchen Laser es ausgelöst wurde. Das zentrale Bauelement für die Steuerung der Alternierung war ein akustooptischer Modulator, mit dessen Hilfe man einzelne Laserlinien aktivieren kann. Ein Pulsgenerator sorgte für das Signal zum Umschalten von einer Laserlinie auf die andere. Dasselbe Signal des Pulsgenerators wurde verwendet, um in den Datenstrom Marker einzubringen, sodass jedem Photon eine Anregungswellenlänge zugeordnet werden konnte.

Der Datenstrom aus Photonen und Markern musste analysiert werden. Dazu wurde während dieser Arbeit ein Programm geschrieben, das die Daten entsprechend aufbereitet, so dass sie mit externen Programmen visualisiert werden können. Das Programm verfügt über zwei Methoden Bursts zu erkennen: Eine arbeitet mit festen Zeitintervallen, die andere analysiert die Gesamtlänge des Bursts. Diese beiden Routinen wurden verglichen, wobei letztere zu einer besseren Statistik führte.

Der Aufbau mit alternierender Laseranregung wurde charakterisiert. Zunächst wurde gezeigt, dass sich einfach und doppelt markierte Proben voneinander trennen lassen. Eine Trennung von nur mit dem Donorfarbstoff und doppelt markierten Proben, bei denen kein FRET stattfindet, wurde demonstriert. Dies war mit herkömmlichen FRET-Messungen kaum möglich. Mittels Kreuzkorrelationsmessung wurde festgestellt, dass sich die FWHM der beiden Anregungswellenlängen genügend überlappen, dass damit Zweifarbexperimente durchgeführt werden können. Das Antwortverhalten des AOM zeigte, dass zwischen den Anregungspulsen eine Pause von mindestens $15\text{ }\mu\text{s}$ eingefügt werden muss. Des Weiteren wurde der Einfluss der Auswahlkriterien für die Bursts beispielhaft an einer Probe untersucht. Dabei wurde das grundsätzliche Verfahren dargestellt, um auch für anderen Proben oder eine andere Zielsetzung die Grenzen für die Burstdauer und die Photonenrate festlegen zu können. Bei alternierender Anregung können auch Anregungssequenzen benutzt werden, bei denen der Donor länger als der Akzeptor direkt angeregt wird. Der Vorteil hiervon ist eine bessere Statistik bei der Bestimmung der Abstandsverteilung der Fluorophore. Hierbei hat sich gezeigt, dass die softwareseitige Korrektur für die ungleiche Bestrahlungsdauer dazu führt, dass der Bereich der nur mit dem Donor markierte Proben zu geringeren Stöchiometriefaktoren S hin ausschmiert. Dadurch ist eine saubere Trennung von einfach und doppelt markierten Proben nicht mehr möglich, die alternierende Laseranregung verliert ihren Vorteil gegenüber herkömmlichen FRET-Messungen.

6.2 Ausblick

Bei der in dieser Diplomarbeit durchgeführten Erweiterung des vorhandenen Einzelmolekül-FRET-Spektrometers um alternierende Laseranregung lassen sich noch einige Verbesserungen anbringen.

Software

Auf Seiten der Analysesoftware ist eine grafische Oberfläche wünschenswert, welche die Ergonomie deutlich verbessern würde. Zudem ist die Implementation einer Burstanalyse auf Basis der Interphotonzeit denkbar, wie sie auch im Programm FRETtchen bei klassischen FRET-Messungen verwendet wird.

Eine deutlich präzisere Bestimmung der Proximity Ratio ermöglicht die Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse. Mit dieser lässt sich unterscheiden, ob die Breite einer Verteilung nur statistisch bedingt ist oder ob die Dynamik des Systems für eine zusätzliche Verbreiterung verursacht. Eine Implementation dieser Technik wird als sinnvoll erachtet.

Hardware

Großen Zugewinn an Komfort verspricht die Steuerung der Alternierung durch eine PC-Messkarte. Dadurch entfielen die bisweilen etwas schwierige Einstellung der richtigen Pulssequenz am Pulsgenerator. Außerdem sollte diese Karte eine genügend hohe Kapazität der Ausgangsspannung bieten. Momentan liegen die erzielbaren Photonenraten noch deutlich unterhalb des Möglichen. Da die Ausgangsspannung des Pulsgenerators auf drei Abnehmer (AOM, Oszilloskop und die Einkoppeleinheit für das Setzen der Marker) verteilt wird, stehen die für die Maximalleistung der Laser nötigen 10 V am AOM nicht zur Verfügung.

Unterschiedlich lange Anregungspulssequenzen versprechen eine bessere Photonenstatistik bei der Bestimmung der Proximity Ratio P . Die softwareseitige Korrektur der kürzeren Beleuchtungszeit mit dem Akzeptorlaser erwies sich als starker Eingriff in die Daten und hinterließ Artefakte, welche die Auswertung beeinträchtigen. Eine weitere Möglichkeit, die unterschiedlich langen Pulsdauern zu kompensieren, besteht in der Erhöhung der Leistung des Akzeptorlasers. Dadurch wird der Akzeptor jedoch deutlich höheren Energiedichten ausgesetzt. Es müssen hierfür also intensive Untersuchungen der Photophysik des Akzeptorfarbstoffs durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Laserintensität zu erhöhen, besteht darin, die Polarisationsabhängigkeit des Teilungsverhältnisses des Strahlteilers auszunutzen, der die Laserstrahlen auf die beiden Mikroskope verteilt. Da der Ar-Kr-Laser linear polarisiertes Licht erzeugt, kann die Transmission zwischen ungefähr 60% und 80% variiert werden. Dazu wird vor dem Strahlteiler ein drehbares $\lambda/2$ -Plättchen platziert, welches die Polarisationssebene des Laserstrahls dreht, und jeweils hinter dem Strahlteiler ein weiteres, welches die Polarisation weiter zurückdreht, so dass das Licht in optimaler Polarisationssebene in den AOM trifft.

Der Ausbau der vorhandenen Messmethoden zu einer Multiparameteranalyse ermöglicht eine genauere Trennung der einzelnen Spezies. Hierbei können zusätzlich zur Intensität noch die Anisotropie des Fluoreszenzlichts sowie die Lebensdauer des an-

geregten Zustands der Farbstoffe bestimmt werden. Aus der Anisotropie lassen sich Informationen für die räumliche Orientierung der elektrischen Dipole der Fluorophore zueinander gewinnen. Die Bestimmung der Lebensdauer ermöglicht Rückschlüsse auf die chemische Umgebung der Farbstoffe.

Eine weitere Möglichkeit, bei einer Messung mehr über das betrachtete System herauszufinden, ist die Verwendung von drei Fluoreszenzfarbstoffen. Dies wurde sowohl mit einer Anregungswellenlänge [6] als auch mit Alternierung dreier entsprechender Laserlinien [27, 40] erfolgreich gezeigt.

A Anhang

A.1 Typischer Ablauf einer ALEX-Messung mit anschließender Auswertung

Messung

1. Das Mikroskop wird wie bisher über FCS-Messungen justiert.
2. Das Hintergrundrauschen im leeren Puffer wird im kontinuierlichen Laserbetrieb bestimmt. Es werden sowohl Werte für den Donor- als auch den Akzeptorlaser bestimmt, da das Rauschverhalten von der Anregungswellenlänge und der Intensität abhängt. Am AOM ist dabei die Leistung der beiden Laserlinien so einzustellen, wie sie später im Experiment verwendet wird.
3. Mit einer NoFRET-Probe wird bei der gewünschten Pulssequenz das Intensitätsverhältnis bei Donor- zu Akzeptoranregung bestimmt. Möchte man den S-Raum so justieren, dass eine doppelt markierte Probe um $S = 1/2$ liegt, so passt man die Laserleistung beider Anregungslinien entsprechend an. Lässt es sich nicht vermeiden, so kann auch über den Parameter *D_A_Ratio* die Photonrate des Akzeptorkanals skaliert werden. Möchte man verschiedene Stöchiometrien der Farbstoffe aufzuschlüsseln können auch andere Korrekturfaktoren eingesetzt werden, so dass z.B. die Konfiguration 1 Donor, 1 Akzeptor bei $S = 2/3$ und 1 Donor, 2 Akzeptoren bei $S = 1/3$ liegt.
4. Um das Übersprechen zu bestimmen, wird eine nur donormarkierte Probe vermessen und der Parameter *crossstalk* so angepasst, dass für diese Probe $P = 0$ ist.
5. Zur Bestimmung der direkten Anregung wird für eine NoFRET-Probe unter Berücksichtigung des soeben bestimmten Korrekturfaktors für das Übersprechen der Parameter *direct_exc* so justiert, dass $P = 0$ gilt.
6. Damit sind alle relevanten Korrekturgrößen bekannt und die eigentliche Messung kann beginnen.

Auswertung

1. Zunächst wird mit Ausgabemodus 4 ein Histogramm der Burstlängen angefertigt und anhand dessen einen Rahmen für die Burstdauern festlegen. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Längen in Vielfachen der Alternierungsperiodenlänge ausgegeben werden. Dementsprechend muss man dies auf die realen Zeiten umrechnen. Wichtig ist auch, dass man die Periodenlänge, welche das Programm ausgibt, als Grundlage nimmt, denn ist die Periodenlänge in Wirklichkeit nur wenig kürzer als man annimmt, werden die Burst, welche man eigentlich noch in die Auswertung aufnehmen möchte, verworfen. Die Burstlänge kann zwar frei eingestellt werden, jedoch basiert die Berechnung der Dauern auf der Anzahl der Alternierungsperioden. Zur präzisen Bestimmung passender Grenzen siehe auch Kapitel 5.4.1.
2. Ausgabemodus 5 liefert eine Verteilung der Anzahl der Photonen in den Bursts. Damit kann man den Rahmen für die Photonenzahlen in den Bursts abstecken.
3. Mit Ausgabemodus 1 wird ein 2-dimensionales P-S-Diagramm erstellt und in Igor dargestellt (einlesen: Data → Load Waves → Load General Text, und darstellen: Windows → New → Contour Plot). Damit bestimmt man die Begrenzungen des S-Raums.
4. Mit diesen Grenzen wird das P-Histogramm angefertigt und in Igor dargestellt (einlesen: Data → Load Waves → Load General Text, und darstellen: Windows → New Graph).

A.2 Ausgabemodi der Auswertesoftware

Das Programm wird über die Kommandozeile aufgerufen und es müssen vier Parameter übergeben werden:

1. Die einzulesende *.t3r-Datei inklusive Dateiendung,
2. die ASCII-Datei, in die die Daten ausgegeben werden,
3. die zu verwendende Analysemethode:
 - 1: Analyse mit festen Zeitintervallen
 - 2: Analyse auf Basis der ganzen Burstlänge,
4. ein Schalter, der die Art der Datenausgabe bestimmt und folgende Werte annehmen kann:
 - 1: Ausgabe der Histogrammdata für das P-S-Histogramm
 - 2: Ausgabe der Histogrammdata für das P-Histogramm

- 3: Ausgabe von Detailinformationen zu den Bursts. Wird das Programm erweitert oder verbessert, kann mit dieser Ausgabe überprüft werden, wie die Histogrammdaten zustande kommen. Die Ausgabe ist für das jeweils gewählte Analyseverfahren angepasst.
- 4: Dieser Schalter gilt nur bei der Analysemethode 2. Er gibt ein Histogramm der Burstlängen aus. Die Dauer ist jeweils angegeben als Vielfaches der Dauer einer Alternierungsperiode. Mit Hilfe dieses Diagramms kann man grobe Rückschlüsse auf die Diffusionszeit ziehen und die entsprechenden Parameter anpassen, wie im Folgenden bei der Beschreibung der Analyseverfahren dargelegt. Zur präzisen Bestimmung der Parameter *min_burst_time* und *max_burst_time* ist jedoch eine eingehende Analyse (siehe Kapitel 5.4.1) nötig. Ist dieser Schalter aktiviert, werden die Parameter für *min_burst_time* und *max_burst_time* (siehe Kap. 4.2) nicht ausgewertet und alle Burstlängen zwischen 0 und 1 s berücksichtigt.
- 5: Dieser Modus arbeitet bei beiden Analyseverfahren. Er gibt eine Verteilung der Photonenzahl in den Bursts aus. Ähnlich zu Modus 4 werden hier die Parameter *min_photons* und *max_photons* nicht ausgewertet. Beim Analyseverfahren 1 werden alle Burst ab 5 Photonen berücksichtigt, in der zweiten Analysemethode alle Burst mit Photonenzahlen bis *No_Photons_Histo*.
- 6: Wie Modus 5, allerdings wird die Verteilung der Anzahl der Photonen pro Burst nur bei Donoranregung gebildet. Dies gibt Informationen über die Photonenstatistik für die Bildung der P-Histogramme. Um die Photonenstatistik auch nur in einem Teil des S-Raums zu bestimmen, können hierbei über *upper_limit_for_S* und *lower_limit_for_S* die Grenzen des gewünschten S-Raum-Abschnitts festgelegt werden.
- 7: Gibt eine Verteilung der Photonenraten der Bursts aus und kann zur groben Bestimmung der Grenzwerte *min_burstrate* und *max_burstrate* benutzt werden. Auch hier ist jedoch für eine präzise Bestimmung der Parameter eine tiefgehende Analyse (siehe Kapitel 5.4.1) nötig.
- 8: Gibt ein Histogramm der S-Werte aus.

Der Aufruf `ALEX-Analysis.exe input.t3r output.txt 2 1` zum Beispiel liest die binäre Datei `input.t3r` ein, verarbeitet sie mit der Analysemethode auf Basis der gesamten Burstlänge und schreibt die Daten für das P-S-Diagramm in die Datei `output.txt`.

Am einfachsten erfolgt der Programmaufruf über die Batchdatei `ALEX-Analysis.bat`. Mit dieser lassen sich die verschiedenen Ausgabeformate schnell anfertigen. Auch wenn man mit verschiedenen Auswerteparametern in der `alex.ini` experimentiert, bietet diese Batchdatei einen Komfortgewinn.

A.3 Aufstellung aller zur Auswertung zur Verfügung stehenden Parameter

Dies ist eine Übersicht über alle Parameter, welche der Auswertesoftware über die Datei `alex.ini` übergeben werden. In Klammern sind Standardwerte gegeben, welche fest im Quellcode des Programms codiert sind und Anwendung finden, wenn die Datei `alex.ini` nicht gefunden wird oder der entsprechende Eintrag keinen Wert hat.

Parameter, die für beide Burstauswahlverfahren gültig sind

- *gamma* (1): Der Detektionsfaktor. Möchte man statt der Proximity Ratio P die FRET-Effizienz E bestimmen, so muss dieser Wert angepasst werden. Er kann eine reelle Zahl sein.
- *bins* (40): Gibt an, in wieviele Unterteilungen die P- und S-Räume zerlegt werden. Der Wert muss ganzzahlig sein.
- *upper_limit_for_S* (0,8) und *lower_limit_for_S* (0,3): Setzen für die Ausgabe als P-Histogramm die obere und untere Schranke für die S-Werte an, für die Ereignisse im Histogramm berücksichtigt wird. Reelle Zahlen.
- *artefact_filter_Laser0* (6): Bursts, welche von nur akzeptormarkierten Proben kommen, werden als solche erkannt, weil sie während der Akzeptoranregung über der Schwelle der Mindestphotonenzahl liegen. Es werden jedoch über die Zeit des Bursts auch wenige Rauschphotonen im Donorkanal detektiert. Durch die niedrige Zahl an Photonen kommt es bei geringen Stöchiometriefaktoren zu diskreten Werten der Proximity Ratio, welche im P-S-Diagramm als Artefakte zu erkennen sind. Da es sich offensichtlich um detektierte A_{only} -Teilchen handelt, wird für diese $P = 1$ gesetzt, falls die Summe der im Donorkanal detektierten Photonen des Bursts unterhalb der mit diesem Parameter gesetzten Schwelle liegt. Bei diesem Parameter ist allerdings Vorsicht geboten, da er auch FRET-aktive Proben mit sehr geringem Farbstoffabstand als A_{only} klassifiziert. Er sollte also mit Bedacht und abhängig von der gemessenen Probe und der Schwelle *threshold* gewählt werden, so dass er das P-S-Diagramm zwar besser aussehen lässt, das P-Histogramm jedoch nicht beeinflusst. Dieser Parameter muss ganzzahlig angegeben werden.
- *D_A_Ratio* (1,0): Dieser Wert gibt das Intensitätsverhältnis von Donor- zu Akzeptorlaser im gepulsten Betrieb an. Sind die cw-Intensitäten unterschiedlich oder wird eine Anregungssequenz mit verschiedenen langen Pulsen gewählt, so wird das Verhältnis durch diesen Parameter ausgeglichen. Dabei wird die Anzahl detektierter Photonen während Akzeptoranregung skaliert. Diese softwareseitige Skalierung kann jedoch zu Problemen führen (siehe Kapitel 5.4.2). Dieser Wert ist reell anzugeben.

- *crosstalk* (0,04): Der Übersprechungsfaktor, wie er in 2.2.3 beschrieben ist. Reelle Werte.
- *direct_exc* (0,04): Korrekturfaktor für die direkte Anregung. Reelle Werte.
- *background* (Donorlaser: Donorkanal: 500, Akzeptorkanal: 400; Akzeptorlaser: Donorkanal: 300, Akzeptorkanal: 2400): Korrekturfaktoren für das Hintergrundrauschen. Es können für beide Kanäle und für beide Anregungslaser unterschiedliche Werte angegeben werden. Reelle Werte.
- *duration_Laser0* und *duration_Laser1* (beide 0,0002): Die Dauer des Donor- bzw. des Akzeptorpulses, jeweils inklusive der nachfolgenden Pause. Diese Werte werden benötigt, um den Anteil des Hintergrunds richtig bestimmen zu können. Angabe in Sekunden, also reelle Werte.
- *global_boundaries* ($-0,1 < S < 1,1$; $-0,2 < P < 1,1$): Hiermit werden die insgesamt betrachteten Bereich des S- bzw. P-Raumes festgelegt. Werte von korrigierten Daten liegen oft außerhalb des Intervalls $[0;1]$. Die Standardwerte haben sich als sinnvoll erwiesen. Reelle Werte.
- *No_Periods_durationHisto* (50): Dieser Parameter zeigt nur Wirkung bei der Ausgabe eines Histogramms der Burstlängen im Ausgabemodus 4 und bestimmt, bis zu welcher Länge Bursts berücksichtigt werden sollen. Er gibt die Anzahl der Alternierungsperioden an und ist somit ein ganzzahliger Wert. Ist man mehr an den realen Zeiten interessiert, so muss jede Zeiteinheit des Histogramms mit der Alternierungsperiodendauer multipliziert werden. Er sollte nicht zu niedrig angesetzt werden, um wirklich das ganze Spektrum der Burstlängen wiederzugeben.
- *min_photons* (20): Gibt an, wie viele Photonen mindestens in einem Ausbruch vorhanden sein müssen, damit dieser im Histogramm der Burstlängen (Ausgabemodus 4) berücksichtigt wird. Es muss ein ganzzahliger Wert angegeben werden.

Parameter, die nur für die Burstanalyse mit fester Anzahl Alternierungsperioden gelten

- *periods* (8): Die Anzahl Perioden, welche zusammengefasst werden sollen. Der Wert muss ganzzahlig sein.
- *threshold* (50): Ab dieser Anzahl Photonen wird eine zusammengefasste Periode als Burst gewertet. Der Wert muss ganzzahlig sein.
- *skip_comb_periods* (3): Da es in der Regel der Fall ist, dass ein Burst nicht vollständig in den Bereich einer zusammengefassten Alternierungsperiode fällt und sich dadurch auf zwei oder mehrere zusammengefasste Bereiche verteilen.

Es kann somit vorkommen, dass ein einzelner Burst doppelt oder gar mehrfach gezählt wird. Dies zu verhindern ist Aufgabe dieses Parameters. Er gibt an, wie viele zusammengefasste Perioden nach einem detektierten Burst für die weitere Analyse übersprungen werden sollen.

Parameter, die nur für die Burstanalyse auf Basis der gesamten Burstlänge gelten

- *min_burst_time* (0,001) und *max_burst_time* (0,005): Mit diesen Parametern lässt sich die Länge gültiger Bursts festlegen. Streift das Teilchen nur den Fokus, ist die Dauer zu gering. Handelt es sich um ein zu langsam diffundierendes, z.B. durch Verunreinigungen eingebrachtes, Molekül, oder auch zwei Molekülen, die in direkter Folge in den Fokus gelangen, so wird deren Aufenthaltsdauer im Fokus als zu lange deklariert. Die Zeiten werden in Sekunden angegeben, also als reelle Werte.
- *min_burstrate* (25) und *max_burstrate* (80): Hiermit werden Grenzen für das Verhältnis von detektierten Photonen und der Dauer eines Bursts festgelegt. Damit lassen sich Bursts herausfiltern, welche von Teilchen herrühren, die nur durch die Peripherie des Laserfokus gehen. Ebenso können Bursts, welche zur gleichen Zeit von mehreren Teilchen im Fokus erzeugt werden, verworfen werden. Die Grenzen für die Photonenrate werden in kHz angegeben und sind ganzzahlig.
- *burst_threshold* (5): Dies ist die Schwelle, die die Mindestzahl an Photonen in einer Alternierungsperiode bestimmt, damit diese zu einem Burst dazugehörig gezählt werden kann. Ganzzahliger Wert.
- *No_Photons_Histo* (150): Dieser Parameter gibt die maximale Photonenzahl an, bis zu welcher das Histogramm der Photonenzahlen der einzelnen Bursts erstellt werden soll. Er gilt sowohl in Ausgabemodus 5 als auch 6. Er wird ganzzahlig angegeben.
- *Burstrate_Histo* (150): Die maximale Photonenrate, welche im Histogramm der Photonenraten (Ausgabemodus 7) analysiert wird.

A.4 Die Theorie der Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (PDA)

Für gewöhnlich eliminiert man Fehler in FRET-Messungen, indem man die Messwerten um gerätebedingte und photophysikalisch begründete Messungenauigkeiten korrigiert. Ein gänzlich anderer Ansatz stellt die Wahrscheinlichkeitsverteilungsanalyse (PDA: engl. Probability Distribution Analysis) dar. Bei dieser Auswertemethode, welche von

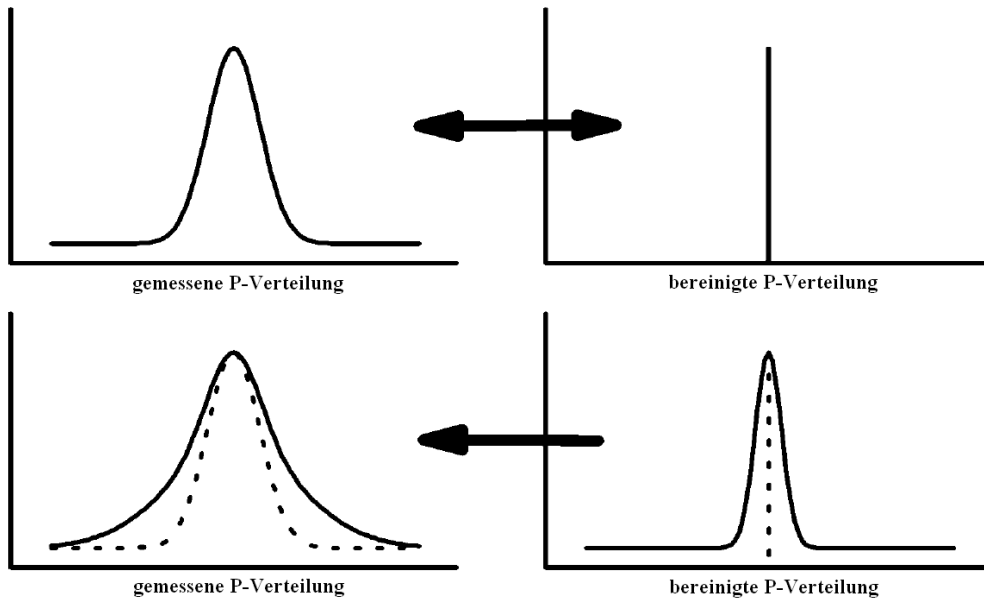


Abbildung A.1: Schematische Darstellung, wie mit Hilfe der PDA unterschieden werden kann, ob die Breite einer Verteilung auf statistischen Effekten beruht oder z.B. durch Dynamik innerhalb der Probe hervorgerufen ist. Links sind die gemessenen Verteilungen skizziert, rechts die mit der PDA um statistische Effekte bereinigte Verteilung. Adaptiert aus [3].

Mitarbeitern der Gruppe von Claus Seidel vorgestellt wurde ([3] und [21]), bezieht man Fehlerquellen gleich mit in die Theorie ein. Der Experimentator bekommt damit die Möglichkeit zu unterscheiden, ob die Breite einer Verteilung auf statistischen Effekten bei der Messung basiert oder ob andere Faktoren, wie z.B. Dynamik innerhalb der Probe, die Ursache sind (siehe Abbildung A.1). Dadurch sind präzise Abstandmessungen bis hin in den Ångströmbereich möglich.¹

Bei bisherigen FRET-Betrachtungen ist die Transferenergie E der Bruchteil der Energie, der vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird. Bei der PDA wird die Transferenergie interpretiert als die Wahrscheinlichkeit, dass die Energie eines von D absorbierten Photons strahlungsfrei auf A transferiert wird. Da die PDA mit unkorrigierten Meswerten arbeitet, betrachtet man nicht mehr die von Donor und Akzeptor emittierten Photonen, sondern die detektierten Signale im roten bzw. grünen Detektionskanal, S_R bzw. S_G .

Das gemessene Signal setzt sich zusammen aus der Anzahl der Fluoreszenzphotonen im roten und grünen Kanal, F_G bzw. F_{RT} , sowie Rauschen im jeweiligen Kanal, B_G und B_R . Die Gesamtzahl ergibt sich somit zu $N = F_G + F_{RT} + B_G + B_R$. Die Index RT beim Fluoreszenzsignal des roten Kanal steht für „rot total“, was bedeutet, dass hier

¹Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass mit der PDA vergleichbare Techniken von I. Gopich [16] und insbesondere auch in Bezug auf ALEX von E. Nir [34] vorgestellt wurden.

das Übersprechen der Donor-Fluoreszenz in den Akzeptorkanal inbegriffen ist.

Die PDA berechnet die theoretische Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Kombination von F_G , F_{RT} , B_G und B_R . Zur besseren Vergleichbarkeit der PDA-Daten mit Daten, welche mit herkömmlichem FRET gewonnen wurden, betrachtet man das Signalverhältnis

$$\frac{S_G}{S_R} = \frac{F_G + B_G}{F_{RT} + B_R} \quad (\text{A.1})$$

Durch das Zählen der Photonen der Bursts erhält man eine endliche Menge an Signalverhältnissen $(S_G/S_R)_i$. Jedem Element dieser Menge wird eine Wahrscheinlichkeit $P(S_G/S_R)_i$ zugeordnet. Viele Werte $(S_G/S_R)_i$ können sich aus mehreren Kombinationen aus F_G , F_{RT} , B_G und B_R zusammensetzen, sodass sich die Wahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Signalverhältnis foldendermaßen ergibt:

$$P\left(\frac{S_G}{S_R}\right)_i = \sum_{\substack{\text{alle Kombinationen von } F_G, F_{RT}, B_G, B_R, \\ \text{die } (S_G/S_R)_i \text{ ergeben}}} P(F_G, F_{RT}, B_G, B_R) \quad (\text{A.2})$$

$P(F_G, F_{RT}, B_G, B_R)$ lässt sich in unabhängige Faktoren aufspalten. Die Rauschterme $P(B_G)$ und $P(B_R)$ sind als statistische Größen natürlich unabhängig. $P(F_G, F_{RT})$ lässt sich schreiben als

$$P(F_G, F_{RT}) = P(F)P(F_{RT} | F), \quad (\text{A.3})$$

wobei $P(F)$ die Wahrscheinlichkeit, dass überhaupt Fluoreszenz auftritt, und $P(F_{RT} | F)$ die Wahrscheinlichkeit, dass F_{RT} aller F Photonen rot sind. Eingesetzt in Gleichung A.2 ergibt dies:

$$P\left(\frac{S_G}{S_R}\right)_i = \sum_{\substack{\text{alle Kombinationen von } F, F_{RT}, B_G, B_R, \\ \text{die } (S_G/S_R)_i \text{ ergeben}}} P(F)P(F_{RT} | F)P(B_G)P(B_R) \quad (\text{A.4})$$

Für Rauschen gilt die Poisson-Statistik [13]:

$$P_{}(B) = \frac{^B e^{-}}{B!} \quad (\text{A.5})$$

wobei $$ für das durchschnittliche Rauschen steht.

$P(F_{RT})$ kann als Binomialverteilung ausgedrückt werden. Sei ϵ die Wahrscheinlichkeit, dass ein emittiertes Photon im roten Kanal detektiert wird. Dann ist

$$P_\epsilon(F_{RT} | F) = \frac{F!}{F_{RT}!(F - F_{RT})!} \epsilon^{F_{RT}} (1 - \epsilon)^{F - F_{RT}} \quad (\text{A.6})$$

Der Parameter ϵ stellt die erscheinende FRET-Effizienz dar und beinhaltet im Gegensatz zur Transfereffizienz E die Quantenausbeute, die Detektionseffizienz und das Übersprechen. Drückt man nun noch die Gesamtzahl der Fluoreszenzphotonen F durch

die Gesamtzahl N aller gemessener Photonen aus, $F = N - B_G - B_R$, so schreibt sich Gleichung A.4 als

$$P\left(\frac{S_G}{S_R}\right)_i = \sum_{\substack{\text{alle Kombinationen von} \\ N, F_{RT}, B_G, B_R, \\ \text{die } (S_G/S_R)_i \text{ ergeben}}} P(N) P_\epsilon(F_{RT} | N - B_G - B_R) P_{<B_G>}(B_G) P_{<B_R>}(B_R) \quad (\text{A.7})$$

bzw. mit Gleichungen A.5 und A.6

$$P\left(\frac{S_G}{S_R}\right)_i = \sum_{\substack{\text{alle Kombinationen von} \\ N, F_{RT}, B_G, B_R, \\ \text{die } (S_G/S_R)_i \text{ ergeben}}} P(N) \frac{F!}{F_{RT}!(F - F_{RT})!} \epsilon^{F_{RT}} (1 - \epsilon)^{F - F_{RT}} \frac{<B_G>^{B_G} e^{-<B_G>}}{B_G!} \frac{<B_R>^{B_R} e^{-<B_R>}}{B_R!} \quad (\text{A.8})$$

Die Rauschterme $P(B_G)$ und $P(B_R)$ kann man bestimmen, indem man eine reine Pufferlösung ohne Fluoreszenzmolekülen misst. Die FRET-Effizienz ϵ wird durch eine χ^2 -GröÙte-Ähnlichkeit-Abschätzung bestimmt.

Die erscheinende und die klassische Transfereffizienz ϵ bzw. E

Die FRET-Effizienz E ist definiert als (2.17)

$$E = \frac{F^A}{F^A + \gamma F^D}.$$

Die gemessenen Signale im roten und grünen Kanal F_G und F_R hängen mit den Emissionen der jeweiligen Fluorophore über Detektionsfaktoren g zusammen:

$$F_G = g_G F_D \quad (\text{A.9})$$

$$F_{RT} = g_R F_A + \alpha g_G F_D, \quad (\text{A.10})$$

Kennt man die GröÙe des Übersprechungsfaktors α von Donoremission in den Akzeptorkanal, kann man zusammen mit der Detektionseffizienz

$$g = \int g'_{\text{Optik}}(\lambda) \times f_{\text{Farbstoff}}(\lambda) d\lambda \quad (\text{A.11})$$

eine Beziehung von scheinbarer (gemessenen) Effizienz ϵ und der Transfereffizienz E herstellen:

$$\epsilon = \frac{F_{RT}}{F_G + F_{RT}} = 1 - \frac{1}{1 + \frac{\Phi_{FA} g_R}{\Phi_{FD} g_G} \frac{E}{1-E} + \alpha}. \quad (\text{A.12})$$

Datenauswertung mit der PDA

Um kompatibel zu älteren Daten zu sein, wird statt ϵ die konventionelle Fluoreszenzrate F_G/F_R betrachtet, wobei $F_R = F_{RT} - \alpha g_G F_D$ die Rate im roten Kanal ohne Crosstalk ist. Um deutlich zu machen, dass es sich hier nicht um eine charakteristische Rate, welche die Verteilung bestimmt, handelt, sondern um eine statistisch schwankende, beobachtete Rate, wird sie in eckige Klammern geschrieben:

$$\left\langle \frac{F_G}{F_R} \right\rangle = \left(\frac{\epsilon}{1 - \epsilon} - \alpha \right)^{-1} \quad (\text{A.13})$$

Aus den gemessenen Wahrscheinlichkeiten $P(S_G/S_R)_i$ wird nun ein Histogramm gebildet, und jeder Balken mit der Gesamtzahl detektierter Moleküle multipliziert. Dadurch erhält man ein Histogramm mit der Anzahl an Molekülen, welche in einen Bereich bestimmten Signalverhältnisses S_G/S_R liegen.

A.5 Quellcode des Analyseprogramms für ALEX-Messdaten

Im Folgenden ist der Quellcode des Programms **ALEX-Analysis** aufgeführt. Die Einleseroutine für die binären *.t3r-Dateien wurde aus dem von PicoQuant mitgelieferten Demoprogramm adaptiert. Für die Schnittstelle zur *.ini-Datei konnte ich eine von Jan Krieger geschriebene Implementation verwenden.

```
/*
This program creates 2D histograms out of data which is recorded in ALEX mode.

The following steps are executed successively:

0)
Structure definitions to access the *.t3r file. In the beginning of the main function
error handling (like "file could not be opened" etc.)

1)
Reading the data from the *.t3r file and saving them in the vector "Periode".

2)
Combining "Perioden" periods to one and saving the in the vector "combined_vector".

3)
If an entry in "combined_vector" comprise more than "threshold" photons it is a burst.
Its P and S are calculated and stored
in the vector "Burst_Vector". The Threshold "threshold" is evaluated for each channel
seperately.

4)
Depending on the mode given as the third argument when calling the program a 2D
histogram of P and S, a 1D histogram of P or other
versions of output are generated and written into the output file. Description of this
argument is given in the batch file
```

```
Hauptprogramm.bat. The histogram data can be further analysed in Igor or comparable
programs.
2D plots in Igor are created with Windows -> New -> Contour Plot.
*/

#include <iostream>
#include <vector>
#include <stdio.h>
#include <string.h>
#include "../jkiniparser2.h" // The Parser for the *.ini-file, written by Jan Krieger

using namespace std;

// The following values are set in the file "alex.ini". Only in the absence of this
// file or if one value is not set these default values are used.

// Number of periods which shall be combined
int Perioden = 8;

// Threshold: If more photons are in the combined period it is counted as a burst
int threshold = 50;

// Number of bins the P and S are divided
int Bins = 60;

// After a burst there is a certain time where no burst shall be counted. This is to
// avoid that one burst ist registered two
// or more times, because the binwise analysis cuts might divide a burst into two or
// more parts depending on the parameter "Perioden".
// It's value is the number of combined periods to be skipped.
int skip_comb_periods = 3;

// If the burst has S values outside these limits they are neglected for the built-up
// of the P histogram
float upper_limit_for_S = 0.8;
float lower_limit_for_S = 0.3;

// The detection factor. For determination of P values this factor is one. If one
// needs the FRET efficiency E, in general this factor is different from one.
double gamma = 1;

// This Filter gives a threshold the sum of the green and red photon excited by the
// blue laser das to exceed.
// This is to avoid artefacts for Aonly-Burst which arise from a low number of photons
// during the blue pulses.
// These would appear as discrete accumulation of bursts in P space with low S.
int artefact_filter_Laser0 = 6;

// If the laser pulses are of different lengths, this correction factor has to be
// defined.
// After adjusting the laser line power in a way that the resulting fluorescence is
// the same for the same puls lengths,
// this factor is the ratio of lengths of blue and yellow excitation F_blue / F_yellow
//
float D_A_Ratio = 1.0;

// For the burstwise analysis these values give the minimum and maximum values for the
// number of photons in a burst
// and the burst duration. They are used to filter the bursts for multi-particle
// events or particles
```

```

// that diffuses through the fringe of the laser focus.
double min_burst_time = 0.001;
double max_burst_time = 0.005;
int min_burstrate = 25;
int max_burstrate = 80;

// For burstwise analysis this is the threshold of one alternation period to be
// accounted as part of a burst
int burst_threshold = 5;

// This parameter sets the maximum time of the burst time histogram (in burstwise
// analysis, mode 4), useful values depend on the
// diffusion time of the particles. It's value is the number of periods, in order to
// get the real durations in the histogram
// multiply with the alternation period duration.
int No_Periods_durationHisto = 50;
// the minimum photon number in a burst for the burst time histogram
int min_photons = 20;

// When creating a histogram of photons per burst (mode 5) this value gives the
// maximum photon number to use in the histogram
int No_Photons_Histo = 150;

// When creating a histogram of the burst rate (mode 7 in burstwise analysis) this
// value gives the maximum burst rate to use in the histogram
int Burstrate_Histo = 150;

// correction factors:
float crosstalk = 0.04;
float direct_exc = 0.04;
int background_acceptor_Laser0 = 400;
int background_donor_Laser0 = 500;
int background_acceptor_Laser1 = 2400;
int background_donor_Laser1 = 300;

float duration_Laser0 = 0.0002;
float duration_Laser1 = 0.0002;

// These values define the range of S and P in the histograms.
float global_lower_boundary_S = -0.1;
float global_upper_boundary_S = 1.1;
float global_lower_boundary_P = -0.2;
float global_upper_boundary_P = 1.1;

struct item1 // the single alternation periods (blue or yellow)
{
    int Laser;
    float rot,gruen;
    double Zeit;
};

struct item2 // everything needed for the combined periods
{
    int first, last;
    // internally the algorithm works with real photon numbers. This needs to be done
    // to avoid rounding effects after correcting
    // for crosstalk etc.
    float rot_Laser0, gruen_Laser0, rot_Laser1, gruen_Laser1;
    double Zeit, duration_burst;
};

struct item3 // these are the P and S values of each detected burst

```



```

{
    float P;
    float S;
    double Zeit;
};

typedef struct{ long int Start;
               long int Step;
               long int End; } tParamStruct;

typedef struct{ long int MapTo;
               long int Show; } tCurveMapping;

/* The following represents the readable ASCII file header portion */

struct {
    char Ident[16];
    char SoftwareVersion[6];
    char HardwareVersion[6];
    char FileTime[18];
    char CRLF[2];
    char CommentField[256]; } TxtHdr;

/* The following is binary header information */

struct {
    long int Channels;
    long int Curves;
    long int BitsPerChannel;
    long int RoutingChannels;
    long int NumberOfBoards;
    long int ActiveCurve;
    long int MeasMode;
    long int SubMode;
    long int RangeNo;
    long int Offset;
    long int Tacq;
    long int StopAt;
    long int StopOnOvfl;
    long int Restart;
    long int DispLinLog;
    long int DispTimeFrom;
    long int DispTimeTo;
    long int DispCountsFrom;
    long int DispCountsTo;
    tCurveMapping DispCurves[8];
    tParamStruct Params[3];
    long int RepeatMode;
    long int RepeatsPerCurve;
    long int RepeatTime;
    long int RepeatWaitTime;
    char ScriptName[20]; } BinHdr;

struct {
    long int BoardSerial;
    long int CFDZeroCross;
    long int CFDDiscrMin;
    long int SyncLevel;
    long int CurveOffset;
    float Resolution; } BoardHdr;

struct {
    long int Globclock;
    long int Reserved1;

```

```

    long int Reserved2;
    long int Reserved3;
    long int Reserved4;
    long int Reserved5;
    long int Reserved6;
    long int SyncRate;
    long int TTTRCFDRate;
    long int TTTRStopAfter;
    long int TTTRStopReason;
    long int NoOfRecords;
    long int SpecialHeaderSize;} TTTRHdr;

// The following data records will appear in the file NoOfRecords times

struct {
    unsigned TimeTag      :16;
    unsigned Channel      :12;
    unsigned Route        :2;
    unsigned Valid        :1;
    unsigned Reserved     :1; } TTTRrecord;

int Runden ( float Zahl) // The conversion from float to int cuts all decimal places.
    Rude, but works.
{
    return Zahl + 0.5;
}

double burst_rate = 5;

int main(int argc, char* argv[])
{
    jkINIParser2 ini; // initialize to read the ini file
    try
    {
        ini.readFile("alex.ini"); // read in an INI file

        Perioden = ini.getAsInt("periods", Perioden);
        threshold = ini.getAsInt("threshold", threshold);
        Bins = ini.getAsInt("bins", Bins);
        gamma = ini.getAsDouble("gamma", gamma);
        upper_limit_for_S = ini.getAsDouble("upper_limit_for_S", upper_limit_for_S);
        lower_limit_for_S = ini.getAsDouble("lower_limit_for_S", lower_limit_for_S);
        artefact_filter_Laser0 = ini.getAsInt("artefact_filter_Laser0",
            artefact_filter_Laser0);
        D_A_Ratio = ini.getAsDouble("D_A_Ratio", D_A_Ratio);

        min_photons = ini.getAsInt("min_photons", min_photons);
        burst_threshold = ini.getAsInt("burst_threshold", burst_threshold);
        min_burst_time = ini.getAsDouble("min_burst_time", min_burst_time);
        max_burst_time = ini.getAsDouble("max_burst_time", max_burst_time);
        min_burstrate = ini.getAsInt("min_burstrate", min_burstrate);
        max_burstrate = ini.getAsInt("max_burstrate", max_burstrate);

        No_Periods_durationHisto = ini.getAsInt("No_Periods_durationHisto",
            No_Periods_durationHisto);
        No_Photons_Histo = ini.getAsInt("No_Photons_Histo", No_Photons_Histo);
        Burstrate_Histo = ini.getAsInt("Burstrate_Histo", Burstrate_Histo);
        skip_comb_periods = ini.getAsInt("skip_comb_periods", skip_comb_periods);

        crosstalk = ini.getAsDouble("crosstalk", crosstalk);
        direct_exc = ini.getAsDouble("direct_exc", direct_exc);
    }
}

```

```

    background_acceptor_Laser0 = ini.getAsInt("background_acceptor_Laser0",
        background_acceptor_Laser0);
    background_donor_Laser0 = ini.getAsInt("background_donor_Laser0",
        background_donor_Laser0);
    background_acceptor_Laser1 = ini.getAsInt("background_acceptor_Laser1",
        background_acceptor_Laser1);
    background_donor_Laser1 = ini.getAsInt("background_donor_Laser1",
        background_donor_Laser1);

    global_lower_boundary_S = ini.getAsDouble("global_lower_boundary_S",
        global_lower_boundary_S);
    global_upper_boundary_S = ini.getAsDouble("global_upper_boundary_S",
        global_upper_boundary_S);
    global_lower_boundary_P = ini.getAsDouble("global_lower_boundary_P",
        global_lower_boundary_P);
    global_upper_boundary_P = ini.getAsDouble("global_upper_boundary_P",
        global_upper_boundary_P);
}
catch (jkINIParser2::error e)
{ // error handling
    cout<<"error: " <<e.getMessage()<<endl;
}

FILE *fpin,*fpout;
long int result,ii,first,last;
string aa;
unsigned long overflows=0;
double offtime=0, truetime=0, burst_rate;
int mode=0, analysis=0, marker=0;
int counts=0;
float kanal0 = 0.0;
float kanal1 = 0.0;
double period_length = 0.0;
item1 rotgruen; // The struct for the photons of one alternation period (blue or
    yellow)
item2 Zusammengefasst;// The struct for the combined periods
item2 Zusammengefasst_after_threshold; //is only used for the No of photons
    histogram in analysis mode 1
item3 Burst; // The struct for the bursts
std::vector<item1> Periode;
std::vector<item2> combined_vector;
std::vector<item2> combined_vector_after_threshold; //is only used for the No of
    photons histogram in analysis mode 1
std::vector<item3> Burst_Vector;
int Histo[Bins + 1][Bins+1]; // The 2D histogram, x-values: P, y-values: S

    int photons = 0;
double duration_burst = 0.0;

if(argc<3)
{
    printf("\nUsage: t3rdemo infile outfile [X]");
    printf("\ninfile is a binary TimeHarp 200 v.5.0 data file (*.t3r)");
    printf("\noutfile (ASCII) will contain: ");
    printf("\n X=0 photon records and header (default)");
    printf("\n X=1 photon records without header");
    printf("\n X=2 extended output incl. special records\n");
    goto ex;
}

if((fpin=fopen(argv[1], "rb"))==NULL)
{printf("\ncannot open input file\n"); goto ex;}

```

```

if((fpout=fopen(argv[2], "w"))==NULL)
{printf("\ncannot open output file\n"); goto ex;}

if(argc>4)
{
    if(strncmp(argv[4], "1", 1)==0) mode=1;
    if(strncmp(argv[4], "2", 1)==0) mode=2;
    if(strncmp(argv[4], "3", 1)==0) mode=3;
    if(strncmp(argv[4], "4", 1)==0) mode=4;
    if(strncmp(argv[4], "5", 1)==0) mode=5;
    if(strncmp(argv[4], "6", 1)==0) mode=6;
    if(strncmp(argv[4], "7", 1)==0) mode=7;
    if(strncmp(argv[4], "8", 1)==0) mode=8;
    if(strncmp(argv[4], "9", 1)==0) mode=9;
    if(strncmp(argv[3], "1", 1)==0) analysis=1;
    if(strncmp(argv[3], "2", 1)==0) analysis=2;
}
if (mode == 0) {printf("\nPlease specify the output mode as the 4th parameter on the
    command line!"); goto ex;}
if (analysis==1 && mode==4) {printf("\nIn binwise analysis you can't choose output
    mode 4!"); goto ex;}
printf("\n
    *****\n\
    nanalysis mode: %d\noutput mode:    %d\n\n
    *****\n"
    , analysis, mode);

result = fread( &TxtHdr, 1, sizeof(TxtHdr) ,fpin);
if (result!= sizeof(TxtHdr))
{
    printf("\nerror reading input file, aborted. 1");
    goto close;
}

if(strncmp(TxtHdr.SoftwareVersion, "5.0", 3))
{
    printf("\nInput file version is %s. This program is for v5.0 only. Aborted.",
        TxtHdr.SoftwareVersion);
    goto close;
}

result = fread( &BinHdr, 1, sizeof(BinHdr) ,fpin);
if (result!= sizeof(BinHdr))
{
    printf("\nerror reading input file, aborted. 2");
    goto close;
}

if (BinHdr.NumberOfBoards != 1)
{
    printf("\nerror: number of boards must be 1, aborted.");
    goto close;
}

result = fread( &BoardHdr, 1, sizeof(BoardHdr) ,fpin);
if (result!= sizeof(BoardHdr))
{
    printf("\nerror reading input file, aborted. 3");
    goto close;
}

result = fread( &TTTRHdr, 1, sizeof(TTTRHdr) ,fpin);
if (result!= sizeof(TTTRHdr))

```

```

{
    printf("\nerror reading input file, aborted. 4");
    goto close;
}

printf("\nNo of Records: %ld\n\n", TTTRHdr.NoOfRecords);

/* v5.0: skip the special header (you may need to read it if you
    want to interpret an imaging file */

fseek(fpin, TTTRHdr.SpecialHeaderSize*4, SEEK_CUR);

//-----
for(ii=0; ii<TTTRHdr.NoOfRecords; ii++) // Reads the *.t3r file and combines the
    photons of one alternation period (blue or yellow)
{
    result = fread( &TTTRrecord, 1, sizeof(TTTRrecord) ,fpin);
    if (result!= sizeof(TTTRrecord))
    {
        printf("\nerror reading input file, aborted. 6");
        goto close;
    }

    truetime = (ofltime + TTTRrecord.TimeTag) * TTTRHdr.Globclock * 1e-9; //
        convert to seconds

    if(TTTRrecord.Valid)
    {
        if (TTTRrecord.Route==0) kanal0 = kanal0 + 1.0;
        if (TTTRrecord.Route==1) kanal1 = kanal1 + 1.0;
    }
    else // this means we have a 'special record'
    {
        if(TTTRrecord.Channel & 0x800) // Overflow
        {
            ofltime += 65536; // unwrap the time tag overflow
            overflows++;
        }

        if (TTTRrecord.Channel & 0x004) // Start marker at Pin 5 (488er Laser)
        {
            if(marker==1)
            {
                rotgruen.gruen = kanal0;
                rotgruen.rot = kanal1;
                rotgruen.Zeit = truetime; // Start timetag of the new alternation is
                    the timetag of the former period
                rotgruen.Laser = 1;
                Periode.push_back(rotgruen);
                kanal0 = 0.0;
                kanal1 = 0.0;
                marker=0;
            }
        }

        if (TTTRrecord.Channel & 0x002) // Start marker at Pin 4 (568er Laser)
        {
            if (marker == 0)
            {
                rotgruen.gruen = kanal0;
                rotgruen.rot = kanal1;
            }
        }
    }
}

```

```

        rotgruen.Zeit = truetime; // Start timetag of the new alternation is
                                // the timetag of the former period
        rotgruen.Laser = 0;
        Periode.push_back(rotgruen);
        kanal0 = 0.0;
        kanal1 = 0.0;
        marker=1;
    }
}
} // end of reading binary

if (analysis==1) // if binwise analysis is chosen
{
    Zusammengefasst.rot_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.rot_Laser1 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser1 = 0.0;
    Zusammengefasst.first = 0;
    Zusammengefasst.last = 0;
    Zusammengefasst.duration_burst = 0;

    for(unsigned int i=1; i < Periode.size(); i++) // Periods are combined to later
        abstract the bursts from them.
    {
        if (Periode[i].Laser == 0)
        {
            Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 + Periode[i].rot;
            Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 + Periode[i].
                gruen;
        }

        if (Periode[i].Laser == 1)
        {
            Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 + Periode[i].rot;
            Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 + Periode[i].
                gruen;
        }

        if (i % (2*Perioden) == 0) // Perioden periods are combined. The factor of 2
            is due to the blue and yellow puls are calculated seperately.
        {
            Zusammengefasst.Zeit = Periode[i].Zeit;
            Zusammengefasst.rot_Laser1 = D_A_Ratio * Zusammengefasst.rot_Laser1;
            Zusammengefasst.gruen_Laser1 = D_A_Ratio * Zusammengefasst.gruen_Laser1;

            // Now the correction factors for crosstalk, direct excitation and
            // background

            // Crosstalk and direct excitation and background:
            Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 - (Zusammengefasst
                .gruen_Laser0 * crosstalk) - (Zusammengefasst.rot_Laser0 * direct_exc)
                - (background_acceptor_Laser0 * duration_Laser0);

            // background:
            Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 - (
                background_donor_Laser0 * duration_Laser0);

            //background only:
            Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 - (
                background_acceptor_Laser1 * duration_Laser1);

```

```

        Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 - (
            background_donor_Laser1 * duration_Laser1);

    if (mode == 5) {threshold = 5;}

    combined_vector.push_back(Zusammengefasst);
    Zusammengefasst.rot_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.rot_Laser1 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser1 = 0.0;
}

}

if (mode==3) {fprintf ( fpout, " blue:red    blue:green  yellow:red   yellow:green
P          S          # of photons  time   \n");}

// Now the bursts are detected via limits in photon numbers and P and S are
// calculated.
for(unsigned int i=0; i < combined_vector.size(); i++) // Evaluate the threshold
// for a burst. It doesn't matter if the threshold is exceeded in the donor or
// acceptor channel.
{
    if( (combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[i].rot_Laser1 +
        combined_vector[i].gruen_Laser0 + combined_vector[i].gruen_Laser1) >
        threshold)
    {
        if (combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[i].gruen_Laser0 <
            artefact_filter_Laser0) {Burst.P = 1.0;}
        else
        {
            Zusammengefasst_after_threshold.rot_Laser0 = combined_vector[i].
                rot_Laser0;
            Zusammengefasst_after_threshold.rot_Laser1 = combined_vector[i].
                rot_Laser1;
            Zusammengefasst_after_threshold.gruen_Laser0 = combined_vector[i].
                gruen_Laser0;
            Zusammengefasst_after_threshold.gruen_Laser1 = combined_vector[i].
                gruen_Laser1;
            combined_vector_after_threshold.push_back(
                Zusammengefasst_after_threshold);
            if (combined_vector[i].rot_Laser0 == 0 && combined_vector[i].
                gruen_Laser0 == 0) {Burst.P = 1.0;}
            else {Burst.P = combined_vector[i].rot_Laser0 / (combined_vector[i].
                rot_Laser0 + (gamma * combined_vector[i].gruen_Laser0));}
        }
    };

    Burst.S = (float) (combined_vector[i].rot_Laser0 + (gamma *
        combined_vector[i].gruen_Laser0)) / ((combined_vector[i].rot_Laser0 +
        (gamma * combined_vector[i].gruen_Laser0) + combined_vector[i].
        rot_Laser1 + combined_vector[i].gruen_Laser1));
    Burst.Zeit = combined_vector[i].Zeit;
    Burst_Vector.push_back(Burst);

    if (mode==3) {fprintf(fpout, "\n%6.2f %10.2f %13.2f %12.2f %15.2f %10.2f
%8i %13f" , combined_vector[i].rot_Laser0, combined_vector[i].
        gruen_Laser0, combined_vector[i].rot_Laser1, combined_vector[i].
        gruen_Laser1, Burst.P, Burst.S, Runden(combined_vector[i].rot_Laser0 +
        combined_vector[i].gruen_Laser0 + combined_vector[i].rot_Laser1 +
        combined_vector[i].gruen_Laser1), combined_vector[i].Zeit);}

    i=i+skip_comb_periods;
}
}

```

```

    }
    printf("\n%i bursts detected\n\n", Burst_Vector.size());

} // end of binwise analysis

if (analysis==2) // if burstwise analysis is chosen
{
    Zusammengefasst.rot_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.rot_Laser1 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser1 = 0.0;
    Zusammengefasst.first = 0;
    Zusammengefasst.last = 0;
    Zusammengefasst.duration_burst = 0.0;
    first=-1;

    period_length = (Periode[4].Zeit - Periode[2].Zeit) * 1000; // in us
    cout << "Alternation period length: " << period_length * 1000 << " us" << endl <<
        endl;
    for(unsigned int i=1; i < Periode.size(); i = i+2)
    {
        // define the start of a burst
        if (first == -1 && Periode[i].Laser == 0 && Periode[i].rot + Periode[i].
            gruen + (D_A_Ratio * Periode[i+1].rot) + (D_A_Ratio * Periode[i+1].gruen)
            >= burst_threshold) {first=i;}
        if (first == -1 && Periode[i].Laser == 1 && (D_A_Ratio * Periode[i].rot) + (
            D_A_Ratio * Periode[i].gruen) + Periode[i+1].rot + Periode[i+1].gruen >=
            burst_threshold) {first=i;}

        if (Periode[i].Laser == 0 && first != -1 && Periode[i].rot + Periode[i].gruen
            + (D_A_Ratio * Periode[i+1].rot) + (D_A_Ratio * Periode[i+1].gruen) <
            burst_threshold) //the end of a burst
        {
            // a filter for statistical fluctuations
            if((float) (Periode[i].rot + Periode[i].gruen + (D_A_Ratio * Periode[i+1].
                rot) + (D_A_Ratio * Periode[i+1].gruen) + Periode[i+2].rot + Periode[i
                +2].gruen + (D_A_Ratio * Periode[i+3].rot) + (D_A_Ratio * Periode[i
                +3].gruen) + Periode[i+4].rot + Periode[i+4].gruen + (D_A_Ratio *
                Periode[i+5].rot) + (D_A_Ratio * Periode[i+5].gruen)) / 3 <
                burst_threshold) // Pseudo Lee filter ;)
            {
                last=i-1;
                for(int j=first; j <= last; j=j+2) //add all Photons in a burst
                {
                    if (Periode[j].Laser == 0)
                    {
                        Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 +
                            Periode[j].rot;
                        Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 +
                            Periode[j+1].rot;
                        Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 +
                            Periode[j].gruen;
                        Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 +
                            Periode[j+1].gruen;
                    }

                    if (Periode[j].Laser == 1)
                    {
                        Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 +
                            Periode[j].rot;
                        Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 +
                            Periode[j+1].rot;
                        Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 +
                            Periode[j].gruen;
                    }
                }
            }
        }
    }
}

```



```

        Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 +
        Periode[j+1].gruen;

    }

    Zusammengefasst.Zeit = Periode[Runden((first + last)/2)].Zeit;
    Zusammengefasst.first = first;
    Zusammengefasst.last = last;
    Zusammengefasst.duration_burst = Periode[last].Zeit - Periode[first].
    Zeit;

    photons = Runden(Zusammengefasst.rot_Laser0 + Zusammengefasst.
        rot_Laser1 + Zusammengefasst.gruen_Laser0 + Zusammengefasst.
        gruen_Laser1);
    duration_burst = Periode[last].Zeit - Periode[first].Zeit;

    // Now the correction factors for crosstalk, direct excitation and
    background

    // Crosstalk and direct excitation and background:
    Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 - (
        Zusammengefasst.gruen_Laser0 * crosstalk) - (Zusammengefasst.
        rot_Laser0 * direct_exc) - (background_acceptor_Laser0 *
        duration_Laser0);

    // background:
    Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 - (
        background_donor_Laser0 * duration_Laser0);

    //background only:
    Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 - (
        background_acceptor_Laser1 * duration_Laser1);
    Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 - (
        background_donor_Laser1 * duration_Laser1);

    //correction for different pulse length and intensities
    Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 * D_A_Ratio;
    Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 *
    D_A_Ratio;

    // if a histogram of burst durations is produced, no limits for the
    burst rate should be set
    if (analysis == 2 && mode == 4) {min_burst_time = 0.0; max_burst_time
    = 1.0;}
    // the same for a histogram of photon counts per burst
    if (analysis == 2 && mode == 5) {min_photons = 0;}
    // and the same for the histogram of the burstrate
    if (analysis == 2 && mode == 7) {min_burstrate = 15; max_burstrate =
    Burstrate_Histo + 1;}

    burst_rate = (Zusammengefasst.rot_Laser0 + Zusammengefasst.
        gruen_Laser0 + Zusammengefasst.rot_Laser1 + Zusammengefasst.
        gruen_Laser1)
        / ((Zusammengefasst.last - Zusammengefasst.first + 1) / 2
        * period_length);

    // this filter allows only bursts to count which have a burst rate
    between min_burstrate and max_burstrate and a duration between
    min_burst_time and max_burst_time
    if (((Periode[last].Zeit - Periode[first].Zeit) > min_burst_time && (
    Periode[last].Zeit - Periode[first].Zeit) < max_burst_time &&
    burst_rate > min_burstrate && burst_rate < max_burstrate)

```

```

    {
        combined_vector.push_back(Zusammengefasst);
    }

    Zusammengefasst.rot_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.rot_Laser1 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser0 = 0.0;
    Zusammengefasst.gruen_Laser1 = 0.0;
    Zusammengefasst.first = 0;
    Zusammengefasst.last = 0;
    Zusammengefasst.duration_burst = 0.0;
    first=-1;
}

}

if (Periode[i].Laser == 1 && first != -1 && (D_A_Ratio * Periode[i].rot) + (
    D_A_Ratio * Periode[i].gruen) + Periode[i+1].rot + Periode[i+1].gruen <
    burst_threshold)
{
    // a filter for statistical fluctuations
    if((float) ((D_A_Ratio * Periode[i].rot) + (D_A_Ratio * Periode[i].gruen)
        + Periode[i+1].rot + Periode[i+1].gruen + (D_A_Ratio * Periode[i+2].
        rot) + (D_A_Ratio * Periode[i+2].gruen) + Periode[i+3].rot + Periode[i
        +3].gruen + (D_A_Ratio * Periode[i+4].rot) + (D_A_Ratio * Periode[i
        +4].gruen) + Periode[i+5].rot + Periode[i+5].gruen) / 3 <
        burst_threshold) // Pseudo Lee filter ;)
    {
        last=i-1;
        for(int j=first; j <= last; j=j+2) //add all Photons in a burst
        {
            if (Periode[j].Laser == 0)
            {
                Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 +
                    Periode[j].rot;
                Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 +
                    Periode[j+1].rot;
                Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 +
                    Periode[j].gruen;
                Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 +
                    Periode[j+1].gruen;
            }

            if (Periode[j].Laser == 1)
            {
                Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 +
                    Periode[j].rot;
                Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 +
                    Periode[j+1].rot;
                Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 +
                    Periode[j].gruen;
                Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 +
                    Periode[j+1].gruen;
            }
        }

        Zusammengefasst.Zeit = Periode[last].Zeit;
        Zusammengefasst.first = first;
        Zusammengefasst.last = last;
        Zusammengefasst.duration_burst = Periode[last].Zeit - Periode[first].
            Zeit;

        photons = Runden(Zusammengefasst.rot_Laser0 + Zusammengefasst.
            rot_Laser1 + Zusammengefasst.gruen_Laser0 + Zusammengefasst.
            gruen_Laser1);
    }
}

```

```

duration_burst = Periode[last].Zeit - Periode[first].Zeit;

// Now the correction factors for crosstalk, direct excitation and
// background

// Crosstalk and direct excitation and background:
Zusammengefasst.rot_Laser0 = Zusammengefasst.rot_Laser0 - (
    Zusammengefasst.gruen_Laser0 * crosstalk) - (Zusammengefasst.
    rot_Laser0 * direct_exc) - (background_acceptor_Laser0 *
    duration_Laser0);

// background:
Zusammengefasst.gruen_Laser0 = Zusammengefasst.gruen_Laser0 - (
    background_donor_Laser0 * duration_Laser0);

//background only:
Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 - (
    background_acceptor_Laser1 * duration_Laser1);
Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 - (
    background_donor_Laser1 * duration_Laser1);

//correction for different pulse length and intensities
Zusammengefasst.rot_Laser1 = Zusammengefasst.rot_Laser1 * D_A_Ratio;
Zusammengefasst.gruen_Laser1 = Zusammengefasst.gruen_Laser1 *
    D_A_Ratio;

// if a histogram of burst durations is produced, no limits for the
// burst rate should be set
if (analysis == 2 && mode == 4) {min_burst_time = 0.0; max_burst_time
    = 1.0;}
// the same for a histogram of photon counts per burst
if (analysis == 2 && mode == 5) {min_photons = 0;}
// and the same for the histogram of the burstrate
if (analysis == 2 && mode == 7) {min_burstrate = 15; max_burstrate =
    Burstrate_Histo + 1;}

burst_rate = (Zusammengefasst.rot_Laser0 + Zusammengefasst.
    gruen_Laser0 + Zusammengefasst.rot_Laser1 + Zusammengefasst.
    gruen_Laser1)
    / ((Zusammengefasst.last - Zusammengefasst.first + 1) / 2
        * period_length);

// this filter allows only bursts to count which have a burst rate
// between min_burstrate and max_burstrate and a duration between
// min_burst_time and max_burst_time
if ((Periode[last].Zeit - Periode[first].Zeit) > min_burst_time && (
    Periode[last].Zeit - Periode[first].Zeit) < max_burst_time &&
    burst_rate > min_burstrate && burst_rate < max_burstrate)
{
    combined_vector.push_back(Zusammengefasst);
}

Zusammengefasst.rot_Laser0 = 0.0;
Zusammengefasst.rot_Laser1 = 0.0;
Zusammengefasst.gruen_Laser0 = 0.0;
Zusammengefasst.gruen_Laser1 = 0.0;
Zusammengefasst.first = 0;
Zusammengefasst.last = 0;
Zusammengefasst.duration_burst = 0.0;
first=-1;
    }
}
}

```

```

for(unsigned int n=0; n < combined_vector.size(); n++)
{
    if (combined_vector[n].rot_Laser0 == 0 && combined_vector[n].gruen_Laser0 ==
        0) {Burst.P = 1.0;}
    if (combined_vector[n].rot_Laser0 + combined_vector[n].gruen_Laser0 <
        artefact_filter_Laser0) {Burst.P = 1.0;}
    else {Burst.P = combined_vector[n].rot_Laser0 / (combined_vector[n].rot_Laser0
        + (gamma * combined_vector[n].gruen_Laser0));}
    Burst.S = (combined_vector[n].rot_Laser0 + (gamma * combined_vector[n].
        gruen_Laser0)) / (combined_vector[n].rot_Laser0 + (gamma * combined_vector
        [n].gruen_Laser0) + combined_vector[n].rot_Laser1 + combined_vector[n].
        gruen_Laser1);
    Burst.Zeit = combined_vector[n].Zeit;
    Burst_Vector.push_back(Burst);
}
printf("\n%i bursts detected\n\n", Burst_Vector.size());
} // end of burstwise analysis

// now the different output modes follow

if (analysis==2 && mode==3)
{
    fprintf(fpout, "D-Laser:red   D-Laser:green   A-Laser:red   A-Laser:green   P
        S           Time           first           last           burst length   burst rate
        # of photons   duration\n");
    for (unsigned int i=0; i < Burst_Vector.size(); i++)
    {
        burst_rate = (combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[i].gruen_Laser0
            + combined_vector[i].rot_Laser1 + combined_vector[i].gruen_Laser1) / ((
            combined_vector[i].last - combined_vector[i].first + 1) / 2 *
            period_length);
        fprintf ( fpout, "\n%8.2f %12.2f %14.2f %12.2f %12f %12f %12.7f %10i %10i
            %11.3f %12.3f %10i %15.7f",
            combined_vector[i].rot_Laser0, combined_vector[i].gruen_Laser0,
            combined_vector[i].rot_Laser1, combined_vector[i].gruen_Laser1,
            Burst_Vector[i].P, Burst_Vector[i].S, Burst_Vector[i].Zeit, combined_vector[i]
            .first, combined_vector[i].last,
            (combined_vector[i].last - combined_vector[i].first + 1) / 2 * period_length,
            burst_rate,
            Runden(combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[i].gruen_Laser0 +
            combined_vector[i].rot_Laser1 + combined_vector[i].gruen_Laser1),
            combined_vector[i].duration_burst);
    }
}

for (int i=0; i < Bins + 1; i++) // fills the 2D histogram with zeros
{
    for (int j=0; j < Bins + 1; j++)
    {
        Histo[i][j]=0;
    }
}

for( unsigned int k = 0; k < Burst_Vector.size(); k++) // writes the 2D histogram
{
    Histo[ (Runden( (float) ((Bins * (Burst_Vector[k].P - global_lower_boundary_P))/ (
        global_upper_boundary_P - global_lower_boundary_P))))] [ (Runden ( (float) ((
        Bins * (Burst_Vector[k].S - global_lower_boundary_S))/(global_upper_boundary_S
        - global_lower_boundary_S))))] += 1;
}

if (mode == 1)
{
    for (int i=0; i < Bins + 1; i++) // Writes the 2D histogram into a file

```

```

{
    for (int j=0; j < Bins + 1; j++)
    {
        fprintf(fpout, "%9f %10f %8i \n", (float) (((global_upper_boundary_P -
            global_lower_boundary_P) * i/Bins) + global_lower_boundary_P), (float)
            (((global_upper_boundary_S - global_lower_boundary_S) * j/Bins) +
            global_lower_boundary_S), Histo[i][j]);
        counts += Histo[i][j];
    }
}

}

if (mode==2) // The following routine writes a histogram of P ***NEW VERSION***
{
    int PHistogramm[Bins + 1];
    for (int i =0; i < Bins + 1; i++) {PHistogramm [i]=0;}
    counts=0;
    float P_sum = 0;
    float average = 0;
    for (unsigned int i=0; i < Burst_Vector.size(); i++)
    {
        if (Burst_Vector[i].S > lower_limit_for_S && Burst_Vector[i].S <=
            upper_limit_for_S)
        {
            counts += 1;
            PHistogramm[ (Runden( (float) (((Bins * (Burst_Vector[i].P -
                global_lower_boundary_P))/ (global_upper_boundary_P -
                global_lower_boundary_P))))] += 1;
        }
    }

    for (int i=0; i < Bins + 1; i++) {P_sum = P_sum + (float) (((
        global_upper_boundary_P - global_lower_boundary_P) * i/Bins) +
        global_lower_boundary_P) * PHistogramm[i];}
    for (int i=0; i < Bins + 1; i++)
    {
        fprintf ( fpout, "%8f %10f \n", (float) (((global_upper_boundary_P -
            global_lower_boundary_P) * i/Bins) + global_lower_boundary_P), (float)
            PHistogramm[i]/counts*100);
    }
    if (counts != 0) {average = P_sum / counts;}
    if (counts != 0) printf ("Average Proximity Ratio = %6f\n\n", average);
    else printf("Average Proximity Ratio: No counts in histogram\n\n");
    printf("Limits in S space:   %1.2f < S <= %2.2f\n\n", lower_limit_for_S,
        upper_limit_for_S);
}

if (analysis==2 && mode == 4) // histogram of burst durations
{
    int No_Periods_Histogram[No_Periods_durationHisto-1];

    for (int i=0; i < No_Periods_durationHisto -1; i++) {No_Periods_Histogram[i] = 0;}
    for (unsigned int i=0; i < combined_vector.size(); i++)
    {
        if (combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[i].rot_Laser1 +
            combined_vector[i].gruen_Laser0 + combined_vector[i].gruen_Laser1 >=
            min_photons)
        {No_Periods_Histogram[(combined_vector[i].last - combined_vector[i].first)
            /2 + 1] += 1;}
    }
    for (int i=1; i < No_Periods_durationHisto -1; i++)
    {

```

```

        fprintf(fpout, "%6i %8i\n", i, No_Periods_Histogram[i]);
    }
}

if (analysis == 2 && mode == 5) // histogram of the number of all photons in a burst
{
    int No_Photons_Histogram[No_Photons_Histo+1];
    for (int i=0; i < No_Photons_Histo+1; i++) {No_Photons_Histogram[i] = 0;}

    for (unsigned int i=0; i < combined_vector.size(); i++)
    {
        No_Photons_Histogram[Runden(combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[i]
            ].rot_Laser1 + combined_vector[i].gruen_Laser0 + combined_vector[i].
            gruen_Laser1)] += 1;
    }
    for (int i=0; i < No_Photons_Histo + 1 ; i++)
    {
        fprintf( fpout, "%6i %8i\n", i, No_Photons_Histogram[i]);
    }
}

if (analysis == 2 && mode == 6) // histogram of the number of photons during donor
    excitation in a burst
{
    int No_Photons_Histogram[No_Photons_Histo+1];
    for (int i=0; i < No_Photons_Histo+1; i++) {No_Photons_Histogram[i] = 0;}
    counts = 0;
    float Photon_Sum = 0.0;
    float average = 0.0;

    for (unsigned int i=0; i < combined_vector.size(); i++)
    {
        if ( Burst_Vector[i].S > lower_limit_for_S && Burst_Vector[i].S <=
            upper_limit_for_S)
        {
            No_Photons_Histogram[Runden(combined_vector[i].rot_Laser0 +
                combined_vector[i].gruen_Laser0)] += 1;counts++;
            Photon_Sum = Photon_Sum + combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[
                i].gruen_Laser0;
        }
    }

    for (int i=0; i < No_Photons_Histo + 1 ; i=i+2)
    {
        fprintf(fpout, "%6i %8f\n", i, (float) (No_Photons_Histogram[i]+
            No_Photons_Histogram[i+1])/counts*100);
    }
    if (counts != 0) {average = Photon_Sum / counts;}
    if (counts != 0) printf ("Average photon number = %6.2f\n\n", average);
    else printf("Average FRET: No counts in histogram\n\n");
    printf("Limits in S space:   %1.2f < S <= %2.2f\n\n", lower_limit_for_S,
        upper_limit_for_S);
}

if (analysis == 1 && mode == 5) // histogram of the number of all photons in a burst
{
    int No_Photons_Histogram[No_Photons_Histo+1];
    for (int i=0; i < No_Photons_Histo+1; i++) {No_Photons_Histogram[i] = 0;}
    for (unsigned int i=0; i < combined_vector_after_threshold.size(); i++)
    {
        No_Photons_Histogram[Runden(combined_vector_after_threshold[i].rot_Laser0 +
            combined_vector_after_threshold[i].rot_Laser1 +
            combined_vector_after_threshold[i].gruen_Laser0 +

```

```

        combined_vector_after_threshold[i].gruen_Laser1]] += 1;
    }
    for (int i=0; i < No_Photons_Histo + 1 ; i++)
    {
        fprintf( fpout, "%6i %8i\n", i, No_Photons_Histogram[i]);
    }
}

if (analysis == 1 && mode == 6) // histogram of the number of photons during donor
    excitation in a burst
{
    int No_Photons_Histogram[No_Photons_Histo+1];
    for (int i=0; i < No_Photons_Histo+1; i++) {No_Photons_Histogram[i] = 0;}
    counts = 0;
    float Photon_Sum = 0.0;
    float average = 0.0;

    for (unsigned int i=0; i < combined_vector_after_threshold.size(); i++)
    {
        if ( Burst_Vector[i].S > lower_limit_for_S && Burst_Vector[i].S <=
            upper_limit_for_S)
        {
            No_Photons_Histogram[Runden(combined_vector_after_threshold[i].rot_Laser0
                + combined_vector_after_threshold[i].gruen_Laser0)] += 1; counts++;
            Photon_Sum = Photon_Sum + combined_vector_after_threshold[i].rot_Laser0 +
                combined_vector_after_threshold[i].gruen_Laser0;
        }
    }
    for (int i=0; i < No_Photons_Histo + 1 ; i=i+2)
    {
        fprintf( fpout, "%6i %8f\n", i, (float) (No_Photons_Histogram[i]+
            No_Photons_Histogram[i+1])/counts*100);
    }
    if (counts != 0) {average = (float) Photon_Sum / counts;}
    if (counts != 0) printf ("Average photon number = %6.2f\n\n", average);
    else printf("Average FRET: No counts in histogram\n\n");
    printf("Limits in S space:   %1.2f < S <= %2.2f\n\n", lower_limit_for_S,
        upper_limit_for_S);
}

if (analysis == 2 && mode == 7) // creates a histogram of burst rates
{
    int Burstrate_Histogram[Burstrate_Histo+1];

    for (int i=0; i < Burstrate_Histo+1; i++) {Burstrate_Histogram[i] = 0;}

    for (unsigned int i=0; i < combined_vector.size(); i++)
    {
        burst_rate = (combined_vector[i].rot_Laser0 + combined_vector[i].gruen_Laser0
            + combined_vector[i].rot_Laser1 + combined_vector[i].gruen_Laser1)
            / ((combined_vector[i].last - combined_vector[i].first + 1) / 2 *
                period_length);
        Burstrate_Histogram[Runden(burst_rate)] += 1;
    }
    for (int i=0; i < Burstrate_Histo + 1 ; i++)
    {
        fprintf( fpout, "%6i %8i\n", i, Burstrate_Histogram[i]);
    }
}

if (mode==8) // The following routine writes a histogram of S
{
    int SHistogramm[Bins + 1];
    for (int i = 0; i < Bins + 1; i++) {SHistogramm [i]=0;}

```

```

counts=0;
float S_sum = 0;
float average = 0;
for (unsigned int i=0; i < Burst_Vector.size(); i++)
{
    counts += 1;
    SHistogramm[ (Runden( (float) ((Bins * (Burst_Vector[i].S -
        global_lower_boundary_S))/ (global_upper_boundary_S -
        global_lower_boundary_S))))] += 1;
}

for (int i=0; i < Bins + 1; i++) {S_sum = S_sum + (float) (((
    global_upper_boundary_S - global_lower_boundary_S) * i/Bins) +
    global_lower_boundary_S) * SHistogramm[i];}

for (int i=0; i < Bins + 1; i++)
{
    fprintf ( fpout, "%8f %10f \n", (float) (((global_upper_boundary_S -
        global_lower_boundary_S) * i/Bins) + global_lower_boundary_S), (float)
        SHistogramm[i]/counts*100);
}
if (counts != 0) {average = S_sum / counts;}
if (counts != 0) printf ("Average S = %6f\n\n", average);
else printf("Average S: No counts in histogram\n\n");
}

if (mode==2) {printf("%i of %i burst are neglected due to limits in S space. \nThis
    means %i burst are accounted for in the P-histogram.\n", Burst_Vector.size() -
    counts, Burst_Vector.size(), counts );}
if (mode==6) {printf("%i of %i burst are neglected due to limits in S space. \nThis
    means %i burst are accounted for in the histogram of photon numbers.\n",
    Burst_Vector.size() - counts, Burst_Vector.size(), counts );}
if (mode==1) {printf("Number of burst in the 2D histogram: %8i\n", counts);}

close:
    fclose(fpin);
    fclose(fpout);

ex:
    printf("\npress return to exit");
    getchar();
    return(0);
}

```


Danksagung

Viele Leute haben, direkt oder indirekt, dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit erfolgreich abschließen konnte.

Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski danke ich für die Möglichkeit, dass ich diese interessante, interdisziplinäre Arbeit unter seiner Betreuung anfertigen konnte.

Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer danke ich, dass er sich bereit erklärt hat, die Betreuung von Seiten der Physikfakultät zu übernehmen.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe verdanke ich ein fröhliches Jahr mit tollen Gesprächen und viel Spaß bei der Arbeit.

„Meinem Postdoc“ Alex danke ich dafür, dass er mich in die Materie eingearbeitet hat und für die ultrakritische Durchsicht dieser Diplomarbeit. Du hast wirklich vom Besten gelernt!

Meiner Freundin Eva gebührt großer Dank dafür, dass sie mich immer wieder aufgebaut hat, wenn es mal nicht wie gewünscht lief; und für das Verständnis, dass wir uns in der Endphase oft erst lange nach Sonnenuntergang sehen konnten.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben und mich, wo immer es ging, unterstützt haben.

All meinen Freunden hier in Heidelberg, denen ich einige wunderschöne Jahre verdanke, namentlich Krishna, Ike, Markus, Christoph, Fabienne, Simone, Sylvie, Kira, Schorsch, Maud und alle aus der Steckelsgasse.

Ein abschließender Dank geht an alle, die sich, neben Alex, intensiv auf Fehlersuche im Manuskript begeben haben und so maßgeblich zum Ergebnis beigetragen: Krishna, Eva, Christoph und Vera.



Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 2.1 | Jablonski-Diagramm der Fluoreszenz | 6 |
| 2.2 | Absorptions- und Emissionsspektren von Alexa488 und Alexa594 | 7 |
| 2.3 | Jablonski-Diagramm für den Förster-Resonanzenergietransfer | 8 |
| 2.4 | Transferenergie E in Abhängigkeit vom Abstand der beiden Farbstoffe . | 11 |
| 2.5 | Verhältnis von FRET-Effizienz E zu Proximity Ratio P | 13 |
| 2.6 | Emission bei Donor- und Akzeptoranregung | 15 |
| 2.7 | Zeitlicher Verlauf der Emission eines Teilchens im Fokus | 16 |
| 2.8 | Schematische Darstellung eines P-S-Diagramms | 18 |
| 3.1 | Schematische Darstellung der Mikroskopeinheit | 23 |
| 3.2 | Das konfokale Prinzip | 24 |
| 3.3 | Steuerung für die alternierende Laseranregung | 28 |
| 3.4 | Laserpulse bei alternierender Anregung mit entsprechendem Datenstrom | 29 |
| 3.5 | Alternativer ALEX-Aufbau, der in Kapitel 5.3 verwendet wurde | 30 |
| 3.6 | Laserpulse und Marker im Datenstrom des alternativen ALEX-Aufbaus | 30 |
| 4.1 | Zusammenfassung der Alternierungsperioden bei Burstanalyse mit festem Zeitfenster | 32 |
| 4.2 | Burstdetektion mit festen Zeitintervallen | 33 |
| 4.3 | Arbeitsweise der Burstanalyse auf Basis der gesamten Burstlänge . . . | 34 |
| 4.4 | Vergleich der beiden Burstanalysemethoden | 35 |
| 5.1 | P-S-Diagramme für D_{only} -, A_{only} -, NoFRET- und eine FRET-aktive Probe | 40 |
| 5.2 | Vergleich von ALEX und FRET-Messung an einer No-FRET-Probe . . | 42 |
| 5.3 | Vergleich von ALEX und FRET-Messung an einer FRET-aktiven Probe | 43 |
| 5.4 | Kreuzkorrelationsmessung zur Bestimmung des Fokusüberlapps | 44 |
| 5.5 | Anstiegs- und Abfallverhalten des AOM | 45 |
| 5.6 | Photonenverteilung bei Variation der Burstdauer | 47 |
| 5.7 | Vergleich der P-S-Diagramme für unterschiedliche Burstlängen | 48 |
| 5.8 | Abhängigkeit der Photonenzahl von der Photonenrate | 50 |
| 5.9 | Optimale Kombination von Burstlänge und Photonenrate | 52 |
| 5.10 | Diagramme für die Sequenzen mit gleich langen Anregungspulsen . . . | 54 |
| 5.11 | Diagramme der Sequenzen mit längerem Donorpuls | 56 |
| 5.14 | Photonenzahl pro Burst in Abhängigkeit von der Bestrahlzeit | 61 |
| 5.15 | Einfluss der softwareseitigen Skalierung auf eine D_{only} -Probe | 62 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 4.1 | Vergleich der beiden Burstanalysemethoden | 37 |
| 5.1 | Korrelationsfunktionen zur Bestimmung des Fokusüberlapps | 44 |
| 5.2 | Photonenstatistik bei Variation der Burstlänge | 47 |
| 5.3 | Photonenstatistik bei Variation der Photonenrate | 51 |
| 5.4 | Auswerteparameter der unterschiedlichen Anregungssequenzen | 55 |
| 5.5 | Photonenstatistik unterschiedlicher Anregungssequenzen | 60 |
| 5.6 | Relative Konzentrationsbestimmung | 65 |

Literaturverzeichnis

- [1] *Handbuch des akustooptischen Modulators AOTFnC-VIC-TN.*
- [2] ABRAMOWITZ, M. und M. W. DAVIDSON: *Numerical Aperture and Resolution.* Internetdokument:
<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/numaperture.html>.
- [3] ANTONIK, M., S. FELEKYAN, A. GAIDUK und C. A. M. SEIDEL: *Separating Structural Heterogeneities from Stochastic Variations in Fluorescence Resonance Energy Transfer Distributions via Photon Distribution Analysis.* Journal of Physical Chemistry B, 110:6970–6978, 2006.
- [4] ARNOLD, W. und J. R. OPPENHEIMER: *Internal Conversion in the Photosynthetic Mechanism of blue-green Algae.* The Journal of General Physiology, 33:423–435, 1949.
- [5] BAUDENDISTEL, N.: *Zwei-Hybrid-Fluoreszenz Kreuzkorrelationsspektroskopie: In vivo Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen im AP-1-System.* Doktorarbeit, Universität Heidelberg, 2004.
- [6] CLAMME, J.-P. und A. A. DENIZ: *Three-Color Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer.* ChemPhysChem, 6:74–77, 2005.
- [7] COWAN, P. und S. MCGAVIN: *Structure of Poly-L-Proline.* Nature, 176:501–503, 1955.
- [8] DALE, R., J. EISINGER und W. BLUMBERG: *The Orientation Factor in Intramolecular Energy Transfer.* Biophysical Journal, 26:161–194, 1979.
- [9] DENIZ, A., M. DAHAN, J. GRUNWELL, T. HA, A. FAULHABER, D. CHEMLA und P. WEISS, S. UND SCHULTZ: *Singel-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations.* PNAS, 96(7):3670–3675, 1999.
- [10] DENIZ, A. A., T. A. LAURENCE, G. S. BELIGERE, M. DAHAN, A. B. MARTIN, D. S. CHEMLA, P. E. DAWSON, P. G. SCHULTZ und S. WEISS: *Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2.* PNAS, 97(10):5179–5184, 2000.
- [11] FÖRSTER, T.: *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.* Annalen der Physik, 437:55–75, 1947.

- [12] FÖRSTER, T.: *Transfer Mechanisms of Elektronik Excitation*. Discussions of the Faraday Society, 27:7–17, 1959.
- [13] FRIES, J., L. BRAND, C. EGGELING, M. KÖLLNER und C. A. M. SEIDEL: *Quantitative Identification of Different Single Molecules by Selective Time-Resolved Confocal Fluorescence Spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry, 102:6601–6613, 1998.
- [14] GANSEN, A.: *Chromatin at the Nanolevel - Development of a single molecule FRET experiment and analysis of the structure and stability of individual nucleosomes*. Doktorarbeit, Universität Heidelberg, 2008.
- [15] GANSEN, A., K. TÓTH, N. SCHWARZ und J. LANGOWSKI: *Structural Variability of Nucleosomes Detected by Single-Pair Förster Resonance Energy Transfer: Histone Acetylation, Sequence Variation, and Salt Effects*. Journal of Physical Chemistry B, 113 (9):2604–2613, 2009.
- [16] GOPICH, I. und A. SZABO: *Single-molecule FRET with diffusion and conformational dynamics..* Journal of Physical Chemistry, 111:12925–12932, 2007.
- [17] HA, T., T. ENDERLE, D. OGLETREE, D. CHEMLA, P. SELVIN und S. WEISS: *Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor*. PNAS, 93(13):6264–6268, 1996.
- [18] HAUGLAND, R. P.: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Molecular Probes, 9. Aufl.
- [19] HIRSCHFELD, T.: *Optical microscopic observation of single small molecules*. Applied Optics, 15(12):2965–2966, 1976.
- [20] JACKSON, J.: *Classical electrodynamics*. Wiley, 3. Aufl., 2004.
- [21] KALININ, S., S. FELEKYAN, M. ANTONIK und C. A. M. SEIDEL: *Probability distribution analysis of single-molecule fluorescence anisotropy and resonance energy transfer*. Journal of Physical Chemistry B, 111:10253–10262, 2007.
- [22] KAPANIDIS, A. und S. WEISS: *Fluorescence-aided molecule sorting: analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules*. PNAS, 101:8936–8941, 2004.
- [23] KARREMANN, G. und R. STEELE: *On the possibility of long distance energy transfer by resonance in biology*. Biochimica et biophysica acta, 25(2):280–291, 1957.
- [24] KUDRYAVTSEV, V., S. FELEKYAN, A. K. WOŹNIAK, M. KÖNIG, C. SANDHAGEN, R. KÜHNEMUTH, C. A. M. SEIDEL und F. OESTERHELT: *Monitoring dynamic systems with multiparameter fluorescence imaging*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387:71–82, 2007.
- [25] KÜHNEMUTH, R. und C. A. M. SEIDEL: *Principles of Single Molecule Multipa-*

- parameter Fluorescence Spectroscopy*. *Single Molecules*, 2:251–254, 2001.
- [26] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum, 2. Aufl., 1999.
 - [27] LEE, N., A. N. KAPANIDIS und S. WEISS: *Three-color Alternating-Laser Excitation of Single Molecules: Monitoring Multiple Interaction and Distances*. *Biophysical Journal*, 92:303–312, 2007.
 - [28] LEE, N. K., A. N. KAPANIDIS, Y. WANG, X. MICHALET, J. MUKHOPADHYAY, R. H. EBRIGHT und S. WEISS: *Accurate FRET Measurements within Single Diffusing Biomolecules Using Alternating-Laser Excitation*. *Biophysical Journal*, 88:2939–2953, 2005.
 - [29] LIU, H.-W., G. COSA, C. F. LANDES, Y. ZENG, B. J. KOVALESKI, D. G. MULLEN, G. BARANY, K. MUSIER-FORSYTH und P. F. BARBARA: *Single-Molecule FRET Studies of Important Intermediates in the Nucleocapsid-Protein-Chaperoned Minus-Strand Transfer Step in HIV-1 Reverse Transcription*. *Biophysical Journal*, 89(5):3470–3479, 2005.
 - [30] MARGITTAI, M., J. WIDENGREN, E. SCHWEINBERGER, G. F. SCHRÖDER, S. FELEKYAN, E. HAUSTEIN, M. KÖNIG, D. FASSHAUER, H. GRUBMÜLLER, R. JAHN und C. A. M. SEIDEL: *Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1*. *PNAS*, 100(26):15516–15521, 2003.
 - [31] MCKINNEY, S. A., E. TAN, T. J. WILSON, M. K. NAHAS, A.-C. DÉCLAIS, R. M. CLEGG, D. M. J. LILLEY und T. HA: *Single-molecule studies of DNA and RNA four-way junctions..* *Biochem. Soc. Trans.*, 32(Pt 1):41–45, 2004.
 - [32] MOERNER, W. und L. KADOR: *Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid*. *Physical Review Letters*, 62:2535–2538, 1989.
 - [33] MÜLLER, B., E. ZAYCHIKOV, C. BRÄUCHLE und D. LAMB: *Pulsed Interleaved Excitation*. *Biophysical Journal*, 89:3508–3522, 2005.
 - [34] NIR, E. und S. WEISS: *Shot-Noise Limited Single-Molecule FRET Histograms: Comparison between Theory and Experiments*. *Journal of Physical Chemistry B*, 110:22103–22124, 2006.
 - [35] ORDEN, A. V., N. P. MACHARA, P. M. GOODWIN und R. A. KELLER: *Single-molecule identification in flowing sample streams by fluorescence burst size and intraburst fluorescence decay rate*. *Analytical Chemistry*, 70:1444–1451, 1998.
 - [36] PERRIN, F.: *Théorie quantique des transferts d’activation entre molécules de même espèce. Cas des solutions fluorescentes*. *Annales des Chimie et des Physique*, 17:283–314, 1932.
 - [37] PERRIN, F.: *Interaction entre atomes normal et activité. Transferts d’activation. Formation d’une molécule activée*. *Annales de l’Institut Henri Poincaré*, 3:279–

318, 1933.

- [38] PERRIN, J.: *Fluorescence et Radiochimie*. Conseil de Chemie, Solvay, 2iém, Paris, Gauthier & Villar, S. 322-398, 1925.
- [39] PERRIN, J.: *Fluorescence et induction moléculaire par résonance*. Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de l'Academie des Sciences, 184:1097–1100, 1927.
- [40] ROSS, J., P. BUSCHKAMP, D. FETTING, A. DONNERMEYER, C. ROTH und P. TINNEFELD: *Multicolor Single-Molecule Spectroscopy with Alternating Laser Excitation for the Investigation of Interactions and Dynamics*. Journal of Physical Chemistry B, 111 (2):321–326, 2007.
- [41] SCHIMMEL, P. und J. FLORY, P: *Conformational Energy and configurational statistics of Poly-L-Proline*. PNAS, 58:52–59, 1967.
- [42] SCHULER, B.: *Application of Single Molecule Förster Resonance Energy Transfer to Protein Folding*. Humana Press, 2006.
- [43] SCHULER, B., E. LIPMAN und W. EATON: *Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy*. Nature, 419:743–747, 2002.
- [44] SCHWILLE, P., F.-J. MEYER-ALMES und R. RIGLER: *Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Multicomponent Diffusional Analysis in Solution*. Biophysical Journal, 72:1878–1886, 1997.
- [45] SHERA, E., N. SEITZINGER, L. DAVIS, R. KELLER und S. SOPER: *Detection of single fluorescent molecules*. Chemical Physics Letters, 174:553–557, 1990.
- [46] STRYER, L. und R. P. HAUGLAND: *Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler*. PNAS, 58:716–726, 1967.
- [47] TAN, E., T. J. WILSON, M. K. NAHAS, R. M. CLEGG, D. M. J. LILLEY und T. HA: *A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate*. PNAS, 100(16):9308–9313, 2003.
- [48] WEIDEMANN, T., M. WACHSMUTH, M. TEWES, C. RIPPE und J. LANGOWSKI: *Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*. Single Molecules, 3(1):49–61, 2002.
- [49] WIDENGREN, J., V. KUDRYAVTSEV, M. ANTONIK, S. BERGER, M. GERKEN und C. A. M. . SEIDEL: *Single-Molecule Detection and Identification of Multiple Species by Multiparameter Fluorescence Detection*. Analytical Chemistry, 78(6):2039–2050, 2006.
- [50] ZHUANG, X. und M. RIEF: *Single-molecule folding*. Current Opinion in Structural Biology, 13(1):88 – 97, 2003.

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen
als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 14. August 2009

.....